



Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
Programa de Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos

Maria Esther Suárez Alpire

**Alterações citogenéticas em indivíduos que fazem uso de terapia
antirretroviral, portadores ou não do vírus da Imunodeficiência Humana
(HIV)**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Bioprodutos e Bioprocessos como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências

Santos

2023

Maria Esther Suárez Alpire

**Alterações citogenéticas em indivíduos que fazem uso de terapia
antirretroviral, portadores ou não do vírus da Imunodeficiência Humana
(HIV)**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, Programa de Pós graduação
em Bioprodutos e Bioprocessos como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutora em Ciências

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Santos

2023

A457aa Alpire, Maria Esther Suárez.
Alterações citogenéticas em indivíduos que fazem
uso de terapia antirretroviral, portadores ou não do
vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). / Maria
Esther Suárez Alpire; Orientador Daniel Araki
Ribeiro. -- Santos, 2023.
59 p. ; 30cm

Tese (Doutorado - Pós-graduação Interdisciplinar em
Ciências da Saúde) -- Instituto de Saúde e
Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2023.

1. micronúcleo. 2. HIV. 3. instabilidade
genética. 4. terapia antirretroviral. 5.
mutagenicidade. I. Ribeiro, Daniel Araki, Orient.
II. Título.

CDD 610

Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
Instituto de Saúde e Sociedade
Programa de Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos

Chefe do Departamento
Prof. Dr.: Daniel Araki Ribeiro

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
Prof. Dr.: Renata Neves Granito

Maria Esther Suárez Alpire

**Alterações citogenéticas em indivíduos que fazem uso de terapia antirretroviral,
portadores ou não do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**

Presidente da banca

Prof.Dr.: Daniel Araki Ribeiro

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andréa Cristina de Moraes Malinverni

Prof. Dr. Luciana Reis Azevedo-Alanis

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos,

Prof. Dr. Victor Hugo Pereira da Silva

Suplente

Profa. Dra. Viviane Carlin Cordaro

Sumário

Agradecimentos	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolo	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
1.2 VÍRUS HIV	4
1.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV	5
1.4 A TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)	7
1.5 O PAPEL DA TARV NA PREVENÇÃO AO HIV	10
1.6 O TESTE DO MICRONÚCLEO	12
1.7 TESTE DO MICRONÚCLEO, GENOTOXICIDADE E HIV	17
1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 2.....	29
CAPÍTULO 3.....	40
CAPÍTULO 4.....	52
CAPÍTULO 5.....	55
5.1 CONCLUSÃO.....	56
CAPÍTULO 6.....	57
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	58

Agradecimentos

Realizar um trabalho de pesquisa somente é possível graças à colaboração de uma série de pessoas e instituições. Desde que iniciei no mestrado e dei sequência ao doutorado, sempre contei com o apoio do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, meu primeiro contato com este mundo acadêmico, que me aceitou como sua aluna, dando-me a oportunidade de participar do laboratório de Toxicogenômica da Unifesp Baixada Santista. Meu agradecimento ao professor e a todos os colegas de laboratório que desde o início sempre me acolheram e me deram dicas, suporte e ensinamentos que me fizeram evoluir nesta área. Aos colegas Carol Margonato, Victor Hugo, Samuel, Eliene, Bianca, Carol Flygare, Marina, Ingra, Bárbara, Daniel Vitor que participou mais ativamente desta tese, da fase de doutorado, e as incertezas da pandemia, e os colegas Thiago e Lorrany que a apresentaram no XVI Congress of MutaGen-Brazil, a todos meus sinceros agradecimentos, é uma honra ter trabalhado com vocês.

Instituições que tornaram este trabalho possível: UNIFESP, especialmente o Campus Baixada Santista, o secretário Eduardo; CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento à pesquisa científica e tecnológica, e o incentivo à formação de pesquisadores no Brasil; Prefeitura de Santos e a Coordenadoria de Controle de Doenças Infectocontagiosas de Santos (CCDI), que abriga o Serviço de Atendimento Adulto (SAE Adulto), o SAE Infantil, a todos os funcionários, especialmente ao Dr Caseiro e Dra Carolina, enfermeira Priscila que permitiram o acompanhamento do serviço por vários meses, disponibilizando prontuários e informações valiosas para esta tese. Muito obrigada!

Para que eu pudesse me dedicar a tal pesquisa, a cooperação do meu marido Ricardo e compreensão dos meus filhos Henrique e Lara foi fundamental, me apoiando e incentivando a concluir esta etapa. Espero ter inspirado essas “crianças” a manterem sempre o caminho do conhecimento como algo enriquecedor, inovador e fascinante. Agradeço a minha mãe que sempre fez tudo que era possível e impossível para minha formação, ao meu tio Manuel sempre me tirando dúvidas de matérias de exatas, ao meu primo Alberto pelas imagens feitas exatamente como precisava, com todo capricho, e aos grandes amigos que sempre estão presentes na vida, nos momentos bons e difíceis.

Muito obrigada a todos os professores pelas aulas e pela presença nas bancas, agradeço por terem lido e oferecido sugestões que sempre colaboram com o enriquecimento da pesquisa.

Lista de figuras

Figura 1. Morfologia do vírus HIV	5
Figura 2. Ciclo de replicação do HIV: 1. Ligação do vírus à célula; 2. Fusão liberando material viral; 3. Enzima transcriptase reversa (DNA próviral); 4. Enzima Integrase (no núcleo celular, integração ao genoma do hospedeiro); 5. Enzima protease; 6. Montagem de nova partícula; 7. Brotamento; 8. Maturação.....	6
Figura 3. Esquema representativo da formação do micronúcleo tanto de natureza aneugênica (perda do cromossomo) como clastogênica (perda de fragmento cromossômico). Fonte própria	13
Figura 4. A) Fotomicrografia da mucosa bucal corada em H.E. Aumento de 100x; B) Esquema da migração e diferenciação celular pelas diversas camadas do epitélio bucal. Fonte: Imagem adaptada de Nanci, 2017	15
Figura 5. Fotografia de células esfoliadas da mucosa bucal em aumento 1000x. A. Célula Normal; B. Célula com Micronúcleo (seta); C. Broto Nuclear; D. Binucleada; E. Cariorrexe; F. Cariólise; G. Picnose. Fonte própria.....	16

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação dos medicamentos antirretrovirais de acordo ao seu mecanismo de ação. Medicamentos que foram utilizados pelos participantes neste estudo (*)	7
--	---

Lista de abreviaturas, siglas e símbolo

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ART	Antiretroviral Therapy, em inglês
CD4	Grupamento de diferenciação 4 ou cluster of differentiation, em inglês
CL	Cariólise
CR	Cariorrexe
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, em inglês
EUA	Estados Unidos da América
F	Feminino
FDA	Food and Drug Administrations, em inglês
FTC	Entricitabina
gp	Glicoproteína
HCL	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homem que faz Sexo com Homem
IN	Integrase
IPERGAY	Intervention Préventive de l'Exposition aux Risques avec et pour les Gays, em francês
iPrEx	Iniciativa Pré-Exposição
IR	Índice de Reparo
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
M	Masculino
ml	Mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
MD	Metilenodioximetanfetamina
MN	Micronúcleo
N	Normal
NB	Broto Nuclear ou Nuclear bud, em inglês
nm	Nanómetro

OLE	Open Label Extension
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Proteína
PC	Picnose
PrEP	Profilaxia Pré Exposição
PROUD	Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection, em inglês
®	Marca registrada
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SAE	Serviço de Atendimento Especializado
SP	São Paulo
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Fumarato de Tenofovir Desopoxila
TR	Transcriptase Reversa
UNAIDS	Joint United Nations Program on HIV/AIDS
WHO	World Health Organization

RESUMO

Alterações no DNA podem ser observadas através do teste do micronúcleo, uma importante ferramenta de biomonitoramento genotóxico. Este estudo utilizou células esfoliadas da mucosa bucal para avaliar *in vivo* portadores ou não do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e que fazem uso de terapia antirretroviral (TARV), e as possíveis alterações no DNA. Em relação aos portadores de HIV, o estudo envolveu 39 crianças e adolescentes, com idade de 0 a 19 anos, em estudo comparativo (ou transversal), duplo-cego. Um total de 20 crianças portadoras de HIV em uso de terapia antirretroviral (TARV), e 19 crianças e adolescentes do grupo controle, pareados em relação ao sexo e idade foram incluídos. No estudo envolvendo adultos, foram examinados 37 indivíduos, sendo 17 do grupo profilaxia pré exposição (PrEP), que faziam uso de TARV, porém não eram portadores do vírus HIV, e 20 indivíduos do grupo controle, pareados por idade, sexo e hábitos, em estudo comparativo, duplo-cego. Os resultados demonstraram que no grupo HIV, as frequências de micronúcleos (MN) ($p=0,05$), células binucleadas ($p=0,001$) e, brotos nucleares ($p=0,03$); apresentaram aumentos em relação ao grupo controle. Nos parâmetros de citotoxicidade, houve aumento com diferença estatística na frequência de cariorrexe ($p=0,05$). Com relação ao grupo PrEP, os parâmetros de mutagenicidade também estavam aumentados, com diferença estatística significativa para as frequências de micronúcleos ($p=0,0001$); células binucleadas ($p=0,001$); e brotos nucleares ($p=0,078$). Nos parâmetros de citotoxicidade, houve aumento com diferença estatística na frequência de cariorrexe ($p=0,001$). Adicionalmente, foi realizado o índice de sistema de reparo, representado pela fórmula $(CL+CR)/(MN+NB)$, onde ambos grupos de estudo apresentaram menor capacidade de reparo em relação ao grupo controle. Em suma, o uso contínuo destes antirretrovirais induzem danos citogenéticos e de citotoxicidade em células de mucosa oral nos indivíduos portadores independente da presença do vírus HIV.

Palavras-Chave: AIDS; HIV; micronúcleo; genotoxicidade; mutagenidade; sistema de reparo de DNA.

ABSTRACT

DNA alterations can be observed using the micronucleus test, an important genotoxic biomonitoring tool. This study used exfoliated cells from the buccal mucosa to assess in vivo whether or not people with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and those taking antiretroviral therapy (ART), and the possible alterations to their DNA. With regard to HIV carriers, the study involved 39 children and adolescents aged between 0 and 19 in a comparative (or cross-sectional), double-blind study. A total of 20 HIV-positive children taking antiretroviral therapy (ART) and 19 children and adolescents from the control group, matched for sex and age, were included. In the study involving adults, 37 individuals were examined, 17 of whom were in the pre-exposure prophylaxis (PrEP) group, who were using ART but did not have HIV, and 20 individuals in the control group, matched for age, sex and habits, in a comparative, double-blind study. The results showed that in the HIV group, the frequencies of micronuclei (MN) ($p=0.05$), binucleated cells ($p=0.001$) and nuclear sprouts ($p=0.03$) were higher than in the control group. In terms of cytotoxicity parameters, there was a statistically significant increase in the frequency of karyorrhoea ($p=0.05$). With regard to the PrEP group, the mutagenicity parameters were also increased, with a statistically significant difference for the frequencies of micronuclei ($p=0.0001$); binucleated cells ($p=0.001$); and nuclear sprouts ($p=0.078$). In terms of cytotoxicity parameters, there was a statistically significant increase in the frequency of karyorrhoea ($p=0.001$). In addition, the repair system index was analysed, represented by the formula $(CL+CR)/(MN+NB)$, where both study groups showed lower repair capacity compared to the control group. In short, the continuous use of these antiretroviral drugs induces cytogenetic damage and cytotoxicity in oral mucosa cells in HIV-positive and non-HIV-positive individuals.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version).

Keywords: AIDS; HIV; micronucleus; genotoxicity; mutagenicity; DNA repair system.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há 40 anos, convivemos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Desde então, cerca de 85,6 milhões de pessoas foram infectadas mundialmente pelo HIV, cuja predileção pelas células do sistema imunológico, induz a AIDS, síndrome da imunodeficiência humana, responsável pela morte de 40,4 milhões de pessoas desde o início da epidemia (UNAIDS, 2023). Muito estudado, sem cura e sem vacina, a infecção atualmente possui tratamento considerado crônico, diferentemente do início, quando seu diagnóstico, era uma sentença de morte (Brasil, 2018a, Blanco, 2017). A estigmatização da doença infelizmente não teve muito progresso, inicialmente chamada da doença dos 5H, por estar mais presente em determinados grupos, tais como: homossexuais, hemofílicos, haitianos, heroínômanos (usuários de heroína injetável) e hookers (denominação em inglês para as profissionais do sexo); esses grupos ainda permanecem sob discriminação social (Brasil, 2018a). Em adultos, e ainda mais marcante em crianças e adolescentes, o preconceito, exclusão, medo do abandono estão presentes por toda a vida do indivíduo. O silêncio imposto em torno da doença dificulta o entendimento, a compreensão, e consequentemente a adesão ao tratamento, especialmente em crianças e adolescentes (Borges, 2015; Brasil, 2018b).

Segundo a UNAIDS (*Joint United Nations Program on HIV/AIDS*), programa das Nações Unidas, criado em 1996, a fim de ajudar e criar soluções no combate à AIDS, no ano de 2022, 39 milhões de pessoas eram portadores do vírus HIV, e destes, 1,5 milhões eram crianças (0 a 14 anos), com 130 mil novas infecções em 2022 (UNAIDS, 2023).

O relatório mais recente publicado pela UNAIDS, em 2023, indica que apenas 57% destas crianças infectadas estavam em tratamento, e que como consequência da pandemia ocasionada pela Covid-19, o número total diminuiu pela primeira vez na história em 2021, apresentando leve melhora em 2022. Estima-se que aproximadamente, um terço dos bebês nascidos de mães portadoras de HIV não foram testados. A quantidade de meninas adolescentes e mulheres jovens que adquiriram HIV (especialmente na África) foi em torno de 200 mil indivíduos. O fechamento das escolas, serviços de educação e saúde reprodutiva evidenciaram a urgência de reforçar a prevenção ao HIV, no que tange à vulnerabilidade e negligência que cercam especialmente o grupo infanto-juvenil.

Apesar de todos os esforços, o tratamento infantil está em defasagem em relação aos adultos, ou seja, 40% das crianças tem menor probabilidade de receber tratamento, e apesar de representarem 4% da população contaminada, são responsáveis por 15% das mortes relacionadas à AIDS. A situação é mais crítica na África, onde se encontram 80% das crianças

infectadas com o vírus (UNAIDS, 2022b).

No Brasil, desde o início da pandemia, foram notificados mais de 1 milhão de casos na população em geral, e 371.744 óbitos por AIDS. Hoje, tanto as infecções pelo HIV quanto a AIDS fazem parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças (Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017). A AIDS é de notificação compulsória desde 1986, porém as gestantes foram incluídas apenas em 2000, e a infecção pelo HIV, assintomática, somente em 2014. A partir desse momento, foram notificadas 149.591 gestantes, sendo 8.323 somente no ano de 2021. Em 2021, foram registrados 35.246 casos de AIDS, na proporção de 25 homens para cada 10 mulheres. Foram diagnosticados 40.880 novas infecções por HIV em 2021 (Brasil, 2022).

Desde o início da epidemia, mais de 47,5 mil crianças de 0 a 19 anos foram diagnosticadas; a idade de 0 a 5 anos foi considerada referência para avaliar a transmissão vertical, que ocorre quando a mãe transmite HIV ao filho, com queda de 47,2% desde 2009. Ainda assim, é responsável por 85,4% das contaminações de crianças até 13 anos. A partir desta idade, a principal via de contaminação é a sexual. Nos últimos dois anos os casos de AIDS em crianças se manteve estável. Os casos de jovens contaminados, de 15 a 24 anos, representaram 23,7% nos últimos dois anos, e no período de 2011 a 2021, 52.513 pessoas desenvolveram AIDS, evidenciando a importância de políticas públicas constantes de esclarecimento, acesso e adesão à TARV. A taxa de mortalidade de pessoas contaminadas, teve decréscimo de 26,4% entre 2014 e 2021, fato atribuído à TARV. (Brasil, 2021; 2022)

A infecção em crianças sem tratamento apresenta didaticamente três padrões: rápida, que ocorre em 20 a 30% dos casos com quadros graves e risco de morte antes dos 4 anos de idade; normal, que atinge a maioria dos infectados (70 a 80%), com tempo médio de 10 anos de sobrevida; e lenta (menos de 5%) com contagens normais de linfócitos CD4 (Tobin & Aldrovandi, 2013; Pinto Neto et al., 2021).

Os processos patogênicos relacionados ao envelhecimento precoce descritos em adultos soropositivos estão se repetindo em crianças. A exposição contínua ao HIV e o uso prolongado e crônico da TARV, apresentam impacto na longevidade e qualidade de vida dos indivíduos infectados (Pathai et al., 2014; Guaraldi & 2017).

Nos últimos anos, tem sido observado que a ativação imunológica crônica, o aumento da renovação celular e senescência imunológica acelerada, podem levar a alterações no DNA (Singh et al., 2017; Chiappini et al., 2018; Katumba et al., 2020). Mutações são objeto de estudo de alguns autores, e seja em testes em animais (Olivero, 2008; Olivero et al., 2013) ou seres humanos (Witt et al., 2007; Moraes Filho et al., 2016; Lima et al., 2017, Gutierrez-Sevilla et al., 2021), indivíduos com HIV que fazem uso da TARV têm apresentado maiores índices de

instabilidade genômica nos distintos testes biológicos que cumprem essa finalidade.

1.2 VÍRUS HIV

O vírus HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, sendo o responsável pela AIDS (Barré-Sinoussi, 1996). Conforme representado na Figura 1, este vírus estruturalmente possui forma esférica, com cerca de 100nm de diâmetro, apresenta um envelope composto por uma bicamada lipídica, originária da membrana celular da célula hospedeira, responsável por expressar as glicoproteínas capazes de permitir a entrada do vírus na célula. Possui um capsídeo viral proteico, e três enzimas virais: transcriptase reversa; integrase; e protease (Barré-Sinoussi, 1996).

Foram identificados dois tipos, o HIV-1 e HIV-2, este, endêmico na África Ocidental, e menos virulento, já o HIV-1 tem distribuição mundial, considerado responsável pela pandemia do HIV (da Rosa, 2016).

As formas mais conhecidas de contágio são as relações sexuais (vaginal, oral e anal), o uso de seringas (ou agulhas) contaminadas, transfusões de sangue, lesões com instrumentos perfurocortantes contaminados e durante a gravidez (na gestação, parto e na amamentação). O vírus HIV infecta células com receptores específicos, a característica mais marcante da infecção é a depleção seletiva de linfócitos T auxiliares CD4+. Entretanto, o vírus também infecta monócitos, macrófagos, células da micróglia do sistema nervoso central, células de Langerhans, dentre outras (Peçanha 2002; da Rosa, 2016), alterando o material genético da célula hospedeira, com progressiva perda da função do sistema imune (Appay & Sause, 2008).

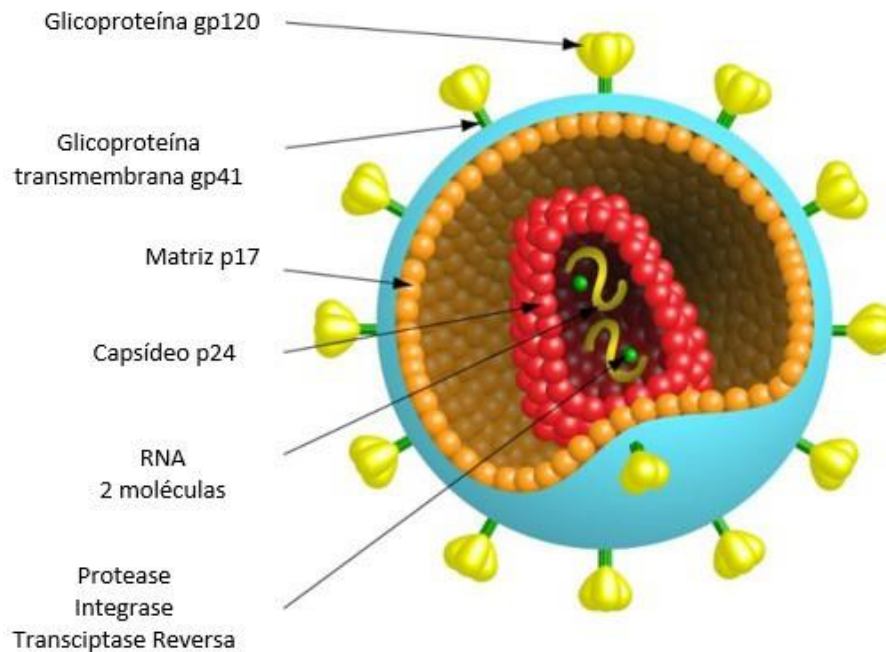


Figura 1. Morfologia do vírus HIV. Adaptado de Ellegård, 2018.

1.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV

A infecção tem início com a ligação da cápsula da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo, através da glicoproteína viral gp120 e quimiocinas. Após a ligação à membrana celular, as proteínas passam por modificações conformacionais que promovem a fusão vírus-célula, permitindo a entrada do capsídeo (Lu e Kim, 1997; Deen et al., 1998). O capsídeo do vírion é então desencapado liberando o RNA e as enzimas virais no citoplasma (Frankel e Young, 1998). A enzima viral transcriptase reversa (TR) promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, esse complexo nucleoproteico é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira (Cohen et al., 1996). Outra enzima viral, integrase (IN), promove a integração estável do DNA viral ao DNA celular, estabelecendo um pró-vírus e completando assim a fase pré-integrativa (Katz e Skalka, 1994). Uma vez que o pró-vírus é integrado ao DNA hospedeiro, comporta-se como um gene residente. Segue-se um período de latência, e então, ocorre ativação dos genes virais, que promoverão a produção de RNA genômico viral e RNA mensageiro viral (Vaishnav e Wong-Staal, 1991). O conjunto de RNAs transcritos são então transportados para o citoplasma; o RNAm utilizará os ribossomos da célula hospedeira para produzir mais proteínas virais, que serão clivadas pela

enzima protease formando os compostos necessários para novas partículas virais, juntamente com o RNA genômico (Hope, 1999).

Os vírions são inicialmente montados próximo à membrana celular (que fará parte da cápsula viral) na forma de partículas imaturas compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais. Durante ou após o “brotamento”, as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação, que consiste na produção de enzimas e proteínas estruturais do capsídeo (Gonda et al., 1985). O processamento das poliproteínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV, que são então capazes de infectar uma célula, especialmente um linfócito adjacente (Peçanha et al., 2002). A Figura 2 representa o ciclo de reprodução do HIV e suas fases.

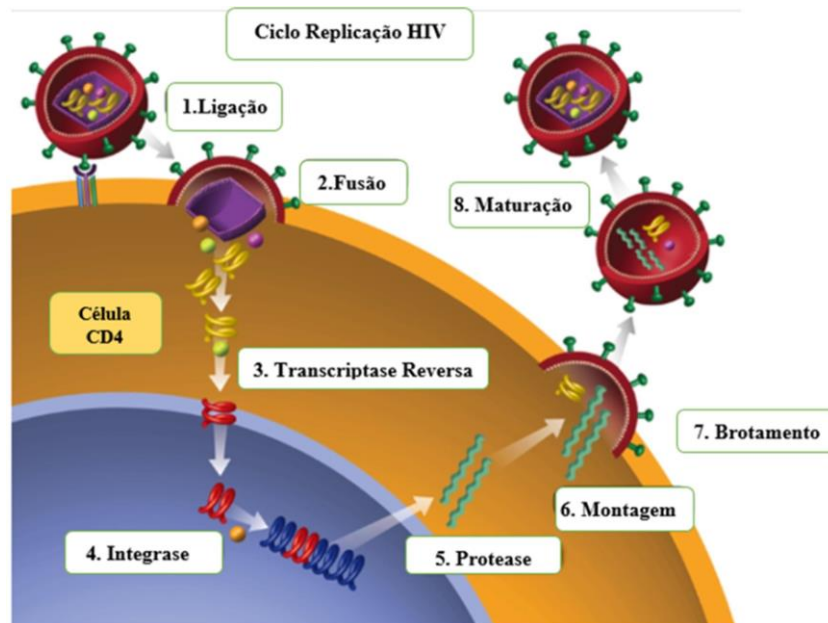


Figura 2. Ciclo de replicação do HIV: 1. Ligação do vírus à célula; 2. Fusão liberando material viral; 3. Enzima transcriptase reversa (DNA próviral); 4. Enzima Integrase (no núcleo celular, integração ao genoma do hospedeiro); 5. Enzima protease; 6. Montagem de nova partícula; 7. Brotamento; 8. Maturação. Adaptado de https://handsonscientist.files.wordpress.com/2021/03/life-cycle-800_hiv.jpg?w=768, 2022

1.4 A TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)

Os medicamentos antirretrovirais são classificados de acordo ao seu mecanismo de ação, correspondendo atualmente a mais de 25 medicamentos divididos em seis classes: inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores de fusão, inibidores da integrase, e inibidores de entrada. Os medicamentos disponíveis no Brasil, segundo sua classe, estão apresentados na Tabela 1. Segundo as diretrizes atuais do Ministério da Saúde, são necessários pelo menos três antirretrovirais combinados, sendo dois medicamentos de classes distintas (Brasil, 2018b).

Tabela 1. Classificação dos medicamentos antirretrovirais de acordo ao seu mecanismo de ação. Medicamentos que foram utilizados pelos participantes neste estudo (*)

Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa	Abacavir Biovir* Didanosina Lamivudina* Tenofovir* Zidovudina*
Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa	Efavirenz* Nevirapina* Etravirina
Inibidores de protease	Atazanavir* Darunavir* Fosamprenavir Lopinavir* Nelfinavir Ritonavir* Saquinavir Tipranavir
Inibidores de fusão	Enfuvirtida
Inibidores da integrase	Dolutegravir* Raltegravir*
Inibidores de entrada	Maraviroc

É importante salientar que a terapia medicamentosa não erradica a infecção, porém visa manter a supressão máxima e sustentada da replicação viral, preservando e/ou restaurando o sistema imune, a fim de retardar a progressão da doença e manter o desenvolvimento normal do organismo (Brasil, 2018b). A TARV tem demonstrado redução da mortalidade, aumento significativo da sobrevida, melhoria na qualidade de vida, obtendo a supressão da carga viral em muitos casos, o que diminui a chance de transmissão, além de prevenir a transmissão vertical em todo o mundo (Nance *et al.*, 2018; Portilla-Tamarit *et al.*, 2021).

Em 2004, um estudo relatou que apenas 26% das crianças obtiveram supressão viral completa com 72 semanas de TARV (Aboulker *et al.*, 2004), contrastando com o percentual observado por Gulick *et al.* (2004) cuja remissão em adultos foi de 89%, após 48 semanas de TARV. No mesmo estudo, os autores demonstraram um percentual de 30% de resistência do HIV à TARV, devido a seleção de mutações do vírus em crianças, acarretando falha virológica, salientando a importância do início precoce e contínua da TARV nesses indivíduos (Aboulker *et al.*, 2004).

Na Europa e Estados Unidos, a taxa de mortalidade infantil apresentou uma queda entre 80 a 90% após a introdução da TARV. Mesmo sendo considerada uma doença crônica, estima-se que a sobrevivência destas crianças seja 30 vezes menor do que uma criança saudável (Chiappini *et al.*, 2018). Distúrbios metabólicos, neurológicos, cardiovasculares, renais e câncer, são complicações não relacionadas à AIDS, entretanto tais enfermidades parecem estar relacionadas ao conjunto de condições de envelhecimento mediados pelo HIV, ou mesmo pelo processo imune inflamatório persistente, ainda que em tratamento (Deeks & Phillips 2009; Guaraldi & Palella 2017).

O alto risco de mortalidade de crianças com HIV no primeiro ano de vida, levou o Brasil, em 2009, à recomendação de iniciar o tratamento em todas crianças menores de 12 anos, independentemente da sintomatologia ou parâmetros laboratoriais. Em 2010, a OMS também adotou a TARV para todos infectados menores de 24 meses (Bazin *et al.*, 2014). Implementado em 2013, no Brasil, o “Tratamento para todos” incluiu a terapia medicamentosa independente do estadiamento da doença. Nos últimos 7 anos, houve redução de 56% de infecções de HIV em bebês expostos infectados pelo HIV, após 18 meses de acompanhamento (Brasil, 2018c). No caso de gestantes soropositivas, quando orientadas e com boa adesão ao tratamento durante o pré-natal, o parto e a amamentação, o risco de transmissão vertical do HIV foi reduzido para menos de 2%. (Tubiana *et al.* 2010; Townsend *et al.*, 2014). A transmissão de cepas do HIV resistentes a uma ou mais classes de drogas, está relacionado a maior chance de falha à TARV, portanto a genotipagem é prioridade (Brasil, 2021). A primeira escolha, segundo as diretrizes nacionais atuais para gestantes, é lamivudina e tenofovir (ou zidovudina ou abacavir), associado ao dolutegravir ou outras combinações (raltegravir, ritonavir, efavirenz).

Em 2018, a OMS restringiu o uso de dolutegravir para gestantes por possível associação com defeitos no tubo neural, entretanto estudos posteriores também avaliando o uso de efavirenz não tem demonstrado tal correlação (Zash *et al.* 2019, Pereira *et al.*, 2021). Outros estudos têm relacionado microcefalia e alterações cognitivas em crianças cujas mães fizeram uso de efavirenz durante a gestação, a partir daí este medicamento é prescrito em casos selecionados (Williams *et al.*, 2020). Segundo o Registro Antirretrovirais na Gestação (www.apregistry.com), com dados de toda Grã-Bretanha e Irlanda, crianças expostas a diversas TARV não demonstraram taxas de malformações congênitas alteradas (Brasil, 2021).

Cumprе ressaltar que a celeridade no diagnóstico é fundamental para dar início ao tratamento. Nos bebês, anticorpos maternos podem permanecer por cerca de 18 meses. Portanto, deve ser realizado o teste molecular para quantificar a carga viral do HIV, assim como o exame qualitativo para detecção material genético do vírus (DNA proviral) (Brasil, 2018d; HHS, 2020).

A profilaxia deve ser feita em todos os casos quando a mãe é soropositiva, de preferência nas primeiras 4 horas de vida. A TARV varia de acordo ao risco, ou seja, alto quando a mãe apresenta carga viral detectável, e baixo quando indetectável. Os bebês são testados no nascimento e aos 2 meses de idade, a criança é considerada infectada com dois resultados de exames de carga viral acima de 5.000 cópias/ml, ou um exame de DNA pró viral positivo, coletados 2 semanas após a profilaxia (Brasil, 2018d). A TARV será guiada pelo exame de genotipagem. Acima de 18 meses, o diagnóstico segue o fluxo da população em geral, realizado por meio de pelo menos dois testes rápidos (imunoensaio simples) com diferentes reagentes, em caso positivo, é feita a coleta para o imunoensaio laboratorial, ELISA (do inglês enzyme-linked immunosorbent assay), e caso positivo, segue para confirmação por meio do teste complementar de Western Blot (eletroforese), seguidos pela quantificação da carga viral, que representa o primeiro teste de monitoramento (Brasil, 2016). Crianças que receberam aleitamento materno, são orientadas a suspender imediatamente, realizar o exame de carga viral e são submetidas à profilaxia pós exposição, e novos exames são coletados duas e seis semanas após o início da medicação. Todos os bebês expostos devem fazer testes até os 18 meses para saber sua sorologia (Brasil, 2018d).

Segundo o protocolo brasileiro, recém-nascidos expostos, aqueles nascidos de mães soropositivas, recebiam zidovudina via oral nas primeiras 4 horas de vida e quando a mãe apresentava alta carga viral (alto risco), ou esta é desconhecida, a nevirapina também é fornecida. Tal protocolo foi alterado em 2021 a fim de se obter melhor eficácia, e hoje são

fornechos 3 medicamentos, a zidovudina, lamivudina e raltegravir, exceto para crianças com idade gestacional abaixo de 34 semanas, quando apenas a zidovudina é administrada. A profilaxia dura 4 semanas, então é feito novo exame. Além disso, devido ao alto risco de pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, em crianças infectadas pelo HIV, com alto índice de mortalidade, todas as crianças expostas recebem profilaxia com o antibiótico sulfametoxazol-trimetoprima a partir de quatro semanas de vida, até que tenham dois exames de carga viral indetectáveis (Brasil, 2021).

Como exposto acima, o tratamento infantil é ainda considerado desafiador tanto pela variação de peso, farmacocinética antirretroviral, resistência à TARV pela exposição prévia como parte da prevenção à transmissão vertical, assim como pela dificuldade da adesão ao tratamento seja pela palatabilidade das drogas como a dependência de cuidadores nas crianças mais novas e, finalmente a estigmatização especialmente na fase de adolescência. Estes fatores dificultam o acompanhamento a longo prazo para este público que é submetido a TARV desde a vida intrauterina e se infectado, necessitará mantê-la durante toda sua vida (Havens 2007; Sigaloff 2011; Boerma et al., 2016; Ankunda et al., 2020).

1.5 O PAPEL DA TARV NA PREVENÇÃO AO HIV

Em 1998 Tsai et al., estudaram o uso do antirretroviral tenofovir em macacos (*Macaca fascicularis*) inoculados com o vírus da imunodeficiência símia, e observaram que quando tratados nas primeiras 24h após infecção, por 28 dias, não apresentaram replicação viral, mesmo após interrupção do tratamento. Grant et al. (2010), no estudo iPrEx (Iniciativa Pré Exposição), com 2.499 participantes de seis países, observaram redução de 44% de infecção por HIV em indivíduos que fizeram uso profilático de tenofovir associado à entricitabina, e relacionaram menor contaminação quando havia melhor adesão ao medicamento. No mesmo ano, Abdool Karim et al. (2010), observaram que o uso de gel vaginal a 1% de tenofovir diminuiu a infecção por HIV entre 39 e 54% das mulheres de acordo à adesão ao uso do gel. Baeten et al. em 2012, no estudo denominado Partners PrEP, analisaram 4.758 casais sorodiscordantes (quando um é HIV positivo e outro negativo), e ao fazer uso profilático de tenofovir uma vez ao dia, houve redução da transmissão do vírus de 67%, e quando associado à entricitabina, de 75%, os medicamentos foram fornecidos em conjunto com outros serviços de proteção. Thigpen et al., (2012) observaram redução de 62,2% da contaminação num estudo com 1.229 heterossexuais que utilizaram tenofovir associado à entricitabina.

Baseados nestes e mais diversos estudos, desde 2012 a *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador dos EUA aprovou o primeiro medicamento para prevenção da infecção por HIV, com nome comercial de Truvada® (Gilead Sciences, Inc, USA) a droga é composta por 300mg de fumarato de tenofovir desopoxila e 200mg de entricitabina (TDF+FTC), decisão seguida pela Agência Europeia de Medicamentos (Holmes, 2012).

Choopanya et al., (2013) analisaram 2413 usuários de drogas injetáveis e houve redução na contaminação em 48,9% com o uso diário de tenofovir. Baeten et al., (2014) compararam o uso isolado do tenofovir e associado à entricitabina, com respostas semelhantes entre estas drogas. Relativos efeitos adversos como redução da função renal, ainda que pequena, foram observadas por Solomon et al., (2014) e Martin et al., (2014). Grant et al., 2014 deram sequência ao estudo iPrEx, com o iPrEx OLE (*Open Label Extension*), com 1.603 mulheres transgênero e HSH, a adesão ao tratamento, acesso ao medicamento, esclarecimento e encorajamento quanto à eficácia do medicamento promoveram redução substancial na transmissão do HIV deste grupo bastante vulnerável. Molina et al., (2015) no estudo IPERGAY, avaliaram o uso de tenofovir e entricitabina oral, em esquema sob demanda, pré exposição sexual (2 comprimidos) e pós (duas doses, 24 e 48h) em HSH, e houve redução da infecção em 86%.

Mirembe et al., (2016), verificaram perda óssea reversível durante as primeiras 24 semanas de uso da PrEP em mulheres africanas. McCormack et al., (2016), em estudo denominado PROUD (Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection), com 544 HSH, verificaram a eficácia de 86%, utilizando diariamente tenofovir e entricitabina, sem ocorrência de efeitos adversos severos, entretanto, náuseas, dor de cabeça e artralgia, resultaram na interrupção da PrEP em alguns casos. Fonner et al., (2016) por meio de uma ampla revisão sistemática e meta-análise constataram a eficácia da PrEP oral, atestando poucos riscos sendo o sucesso está relacionado à adesão contínua ao tratamento proposto.

A OMS, incluiu a PrEP na Lista de Medicamentos Essenciais em 2017. Em 2018 os adolescentes foram incluídos, e cerca de 70 países desde 2019 adotaram a PrEP (Celum & Baeten, 2020).

O tenofovir teve duas formulações testadas quanto à eficácia e segurança, o fumarato de tenofovir usado desde as primeiras pesquisas, e a alafenamida tenofovir, versão que tem se mostrado eficaz com melhor segurança renal e óssea (Wasser et al., 2020). Em 2020, Mayer et al., publicaram o amplo estudo multicêntrico, duplo-cego, denominado Discover, que testou

as duas versões distintas do tenofovir, ambas em conjunto com a entricitabina para PrEP, e a formulação mais recente, contendo alafenamida demonstrou resultados semelhantes ao fumarato quanto à prevenção, com marcadores biológicos mais favoráveis.

No Brasil o medicamento de eleição para PrEP é o mesmo utilizado desde 2012 em alguns países desenvolvidos, associação de 200 mg de entricitabina + 300 mg de Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF+FTC), e que mantém a mesma formulação desde seu lançamento.

1.6 O TESTE DO MICRONÚCLEO

Devido ao constante desafio que o organismo enfrenta tanto em decorrência da infecção pelo HIV, como em uso constante de TARV, os riscos de danos ao DNA relacionados aos distúrbios metabólicos, redução da atividade antioxidante, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, níveis reduzidos de glutathione, entre outros, são aumentados nestes indivíduos (Morimoto et al., 2014; Ivanov et al., 2016; Zizza et al., 2019). Um gene acessório do HIV, chamado Vpr, é responsável por um ciclo celular anormal, e promove instabilidade genômica, levando também, à danos mutagênicos como a formação de micronúcleos. Tais achados foram descritos por Tachiwana et al., em 2006. Diante disso, testes citogenéticos para avaliar alterações cromossômicas de forma mais simples tem sido desenvolvidos e validados nos últimos anos.

Micronúcleos são pequenos fragmentos de núcleos (DNA), presentes no citoplasma de células nucleadas, e são usados como biomarcador de dano cromossômico, instabilidade do genoma e mutagenicidade (Fenech, 2007; Bonassi *et al.*, 2007). Micronúcleos se originam durante a divisão celular, a partir de um dano que excede a capacidade de reparo, podendo levar à perda de um cromossomo inteiro (evento aneugênico), ou de um fragmento de cromossomo (evento clastogênico), e que na fase final da divisão celular, a telófase, recebem um envoltório nuclear, conferindo aspecto semelhante ao núcleo com tamanho menor em relação ao núcleo principal (Thomas et al., 2009) (Figura 3). Uma vez que o dano é transmitido à célula filha, o mesmo é fixado, caracterizando-o como um evento mutagênico (Ribeiro e Marques, 2003).

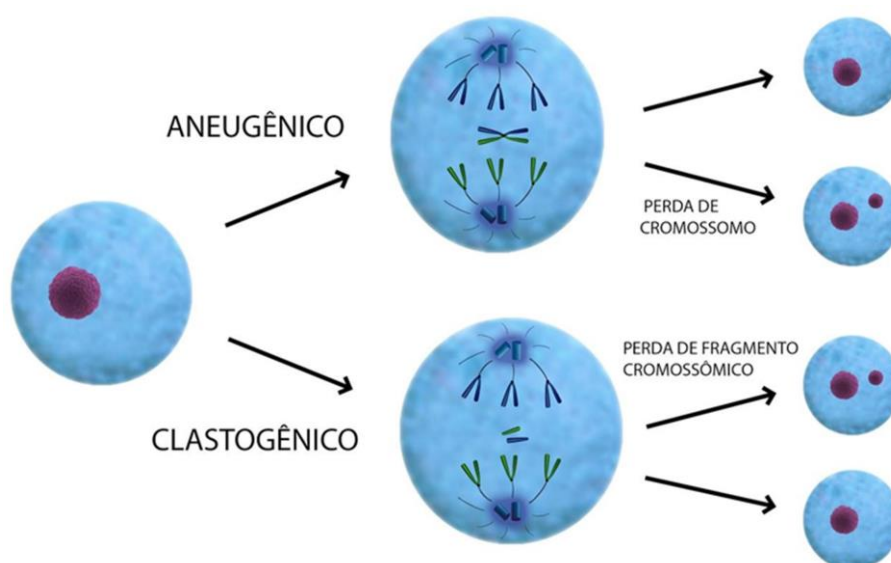


Figura 3. Esquema representativo da formação do micronúcleo tanto de natureza aneugênica (perda do cromossomo) como clastogênica (perda de fragmento cromossômico). Fonte própria.

Conforme o protocolo internacional publicado por Thomas et al. em (2009), para ser considerado micronúcleo, deve ter a mesma coloração do núcleo principal, deve estar no mesmo plano, ter entre 1/3 a 1/16 do tamanho do núcleo principal, e estar totalmente dentro do citoplasma da célula. Uma célula pode ter um ou múltiplos MN. Outra alteração nuclear, descrita inicialmente por Tolbert *et al.*, (1992) como *broken egg* (em inglês), e hoje mais referida como broto nuclear (em inglês, *nuclear bud*), também está relacionada à instabilidade genética, apesar de não ter seu mecanismo de formação ainda bem estabelecido, sugere-se uma possível falha no mecanismo de reparo de DNA, como a eliminação de excesso de material nuclear, ocasionado pelo processo de amplificação gênica. O núcleo principal encontra-se ligado por uma ponte a outro fragmento com características semelhantes ao micronúcleo (Fenech et al., 2011). Células binucleadas apresentam dois núcleos principais semelhantes, que podem estar separados ou até se tocando, com a mesma morfologia dos núcleos de células normais. Sua formação está relacionada à falha na citocinese, por diversos motivos, tais como defeitos na formação do anel do microfilamento, interrupção do ciclo celular, ou disfunção dos telômeros (Thomas et al., 2009; Mantovani et al., 2021).

Os micronúcleos foram descritos inicialmente como corpúsculos de Howell-Jolly em 1901, quando foram observados em glóbulos vermelhos com características patogênicas. Foi somente em 1970 que Schmid e Heddle desenvolveram o teste do micronúcleo a partir de eritrócitos da medula óssea de roedores como um método simples capaz de demonstrar

aberrações cromossômicas e, subsequente mutagenicidade (Mantovani et al., 2021). Em 1976, o teste em cultura de linfócitos humanos foi desenvolvido por Countryman e Heddle. Na década de 80, Stich e Rosin propuseram uma modificação capaz de identificar micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal (Stich et al., 1985). Com a vantagem de ser um teste pouco invasivo e de fácil execução em relação aos demais testes genéticos, mostrou-se desde então um importante biomarcador de efeito, versátil e de baixo custo, cujo foco está na prevenção, predizendo uma interação genômica entre agentes químicos, físicos ou biológicos, idealmente quando ainda não existe doença propriamente dita (Holland et al., 2011; Bolognesi et al., 2015). É um teste reconhecido internacionalmente, considerado robusto, simples e passível de automação, com diretrizes regulatórias estabelecidas (Knasmüller & Fenech, 2019).

A mucosa bucal é composta por epitélio estratificado queratinizado e não queratinizado que é representada pela mucosa de revestimento, e onde é indicada a coleta para o teste do micronúcleo. Esta camada apresenta espessura de aproximadamente 0,4 a 0,5mm. Na porção mais interna se encontram as células basais, onde ocorre a mitose, durante a migração para a superfície externa, ocorre a diferenciação (perda das organelas e acúmulo de glicogênio), passando pelas camadas espinhosa e intermediária até a camada superficial, conforme apresentado na Figura 4 (Mishra et al., 2018). O processo leva em torno de 14 dias (Fehrehabach e Bath-Balog, 2008), e uma vez que a coleta é realizada na camada superficial, podemos concluir que o dano observado ocorreu em um passado recente, tempo em que houve a divisão celular e subsequente migração até a superfície (Thomas et al., 2011).

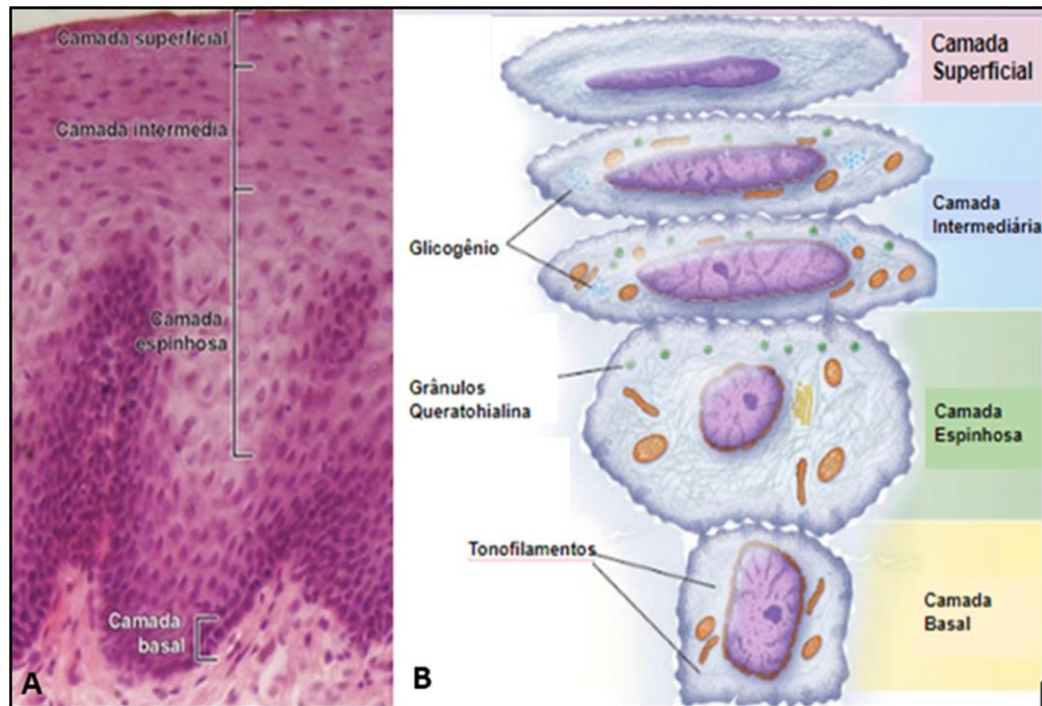


Figura 4. A) Fotomicrografia da mucosa bucal corada em H.E. Aumento de 100x; B) Esquema da migração e diferenciação celular pelas diversas camadas do epitélio bucal. Fonte: Imagem adaptada de Nanci, 2017

Na mesma metodologia, é possível ainda analisar os parâmetros de citotoxicidade, representados pelo processo de morte celular, como: a picnose, cariorrexe e cariólise, seguindo as indicações de Tolbert *et al.* (1992).

Na picnose, o núcleo encontra-se hipercondensado e condensado, cerca de 1/3 a 2/3 menor que um núcleo normal. A cariorrexe é representada por um núcleo fragmentado, e pode representar o estágio final da apoptose. Na cariólise, o núcleo aparece como uma imagem fantasma, ou seja, ausente, pois não há mais presença de DNA, e está relacionada à necrose celular (Thomas *et al.*, 2009; Mantovani *et al.*, 2021). Todas estas alterações estão representadas na Figura 5.

O índice de reparo (IR), proposto por Ramirez & Saldanha em 2002, representado pela fórmula: $IR = (CL + CR) / (MN + NB)$, também foi avaliado, onde o processo de morte celular, representado por CL e CR, precedem o dano celular irreversível representado por MN e NB, assim quanto menor o valor de IR, menor a capacidade de reparo celular.

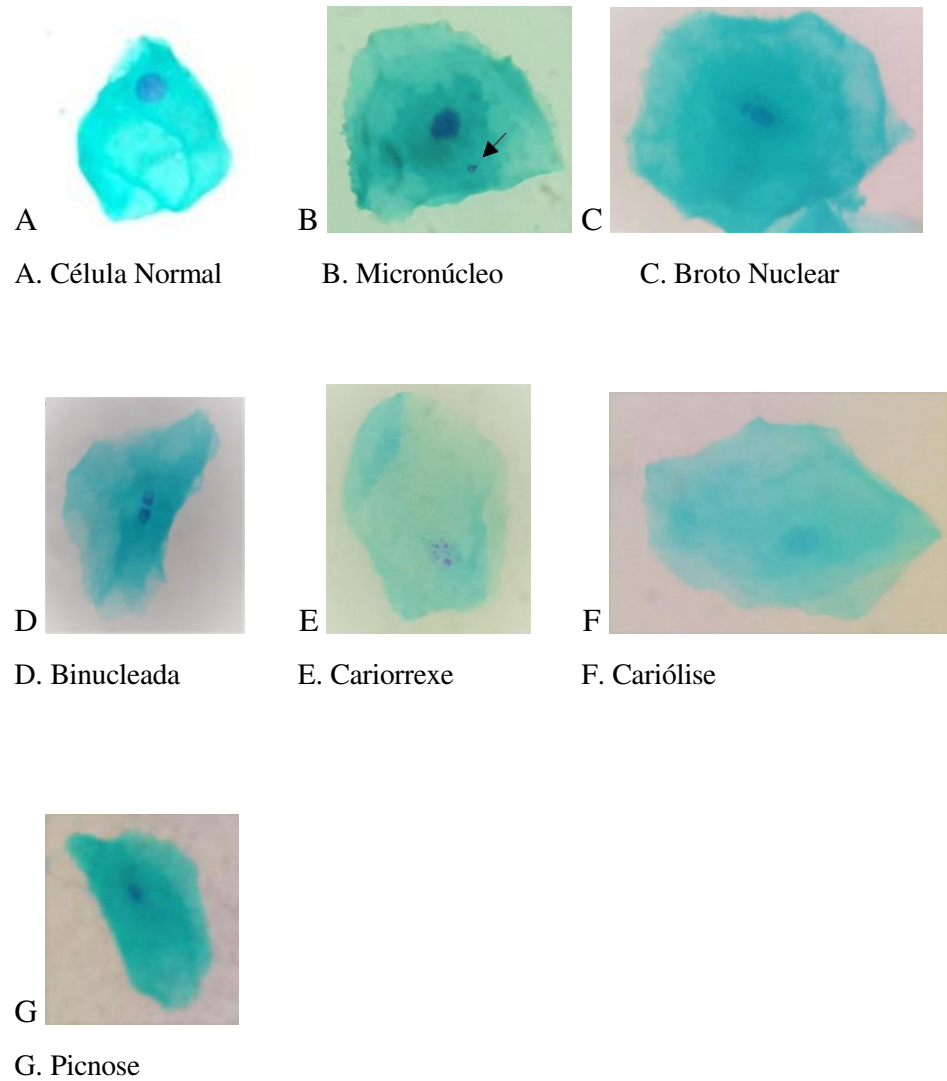


Figura 5. Fotografia de células esfoliadas da mucosa bucal em aumento 1000x. A. Célula Normal; B. Célula com Micronúcleo (seta); C. Broto Nuclear; D. Binucleada; E. Cariorrexe; F. Cariólise; G. Picnose. Fonte própria.

1.7 TESTE DO MICRONÚCLEO, GENOTOXICIDADE E HIV

A genotoxicidade induzida por drogas antirretrovirais estão descritas em alguns estudos experimentais, apesar de poucos estudos envolvendo crianças. Em 2007 Witt et al., avaliaram o dano cromossômico de bebês expostos pela via transplacentária, e observaram aumento de MN em eritrócitos nestes bebês nascidos de mães soropositivas, que faziam uso de zidovudina durante a gestação, e também foram medicados profilaticamente por 6 semanas após o nascimento. A genotoxicidade deste medicamento já havia sido descrita em outros estudos *in vitro* e em modelos animais (Olivero, 2008).

Wu et al., 2012, observaram a genotoxicidade de algumas drogas antirretrovirais, divididas de acordo à classe, os inibidores da transcriptase reversa (entricitabina, lamivudina, tenofovir e zidovudina, usados neste estudo), sendo apenas a entricitabina testou negativa para genotoxicidade. Nos ensaios *in vitro* de micronúcleo de linfócitos humanos e *in vivo* em camundongos, os demais medicamentos foram positivos e a zidovudina foi positiva também no teste de Ames (mutagenicidade reversa bacteriana).

A zidovudina, fármaco sintetizado como agente anticancerígeno nos anos 60, foi o primeiro medicamento utilizado contra o HIV, aprovado em 1987, até hoje é amplamente utilizado por ter atividade aditiva ou sinérgica com quase todos os outros agentes antirretrovirais. É o medicamento de escolha como profilaxia para recém-nascidos devido à sua eficácia na redução da transmissão vertical. Desde 2000 foi classificado pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como grupo 2B, possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2000).

Drogas inibidoras da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, (efavirenz e nevirapina), foram negativos nos ensaios de genotoxicidade (Wu et al., 2012). Ainda neste estudo, as drogas inibidoras da protease (atazanavir, darunavir e ritonavir), apenas o atazanavir foi positivo a partir do teste de aberração cromossômica. Inibidores da integrase (dolutegravir e raltegravir), inibidores de entrada e inibidores de fusão, testaram negativo para genotoxicidade. Apesar da maioria das drogas serem cancerígenas para roedores, os autores associaram a mecanismos não genotóxicos, tais como hepatotoxicidade.

Em 2013, Olivero et al., observaram o uso de TARV, com drogas inibidoras da transcriptase reversa (zidovudina, lamivudina, abacavir, nevirapina) em filhotes de macacas gestantes não portadoras de HIV, que foram medicadas durante a gestação e, que

posteriormente ao nascimento, estes filhotes seguiram a medicação por mais 6 semanas de vida, semelhante ao protocolo humano. A exposição intrauterina e perinatal revelou instabilidade genômica e efeitos mutagênicos que persistiram por 3 anos (ano final da pesquisa), devido à incorporação da droga ao DNA, produzindo anormalidades no centrômero e de fusos resultando em aneuploidia. Como a idade de 3 anos do macaco equivale aproximadamente ao desenvolvimento de 14 anos do ser humano, os autores sugerem o acompanhamento a longo prazo de crianças não infectadas pelo HIV, nascidas de mães infectadas pelo HIV (crianças expostas), para avaliar o potencial de genotóxico persistente.

Moraes Filho et al. (2016) avaliaram citotoxicidade e genotoxicidade de distintas concentrações de TARV compostas por: tenofovir, lamivudina; e zidovudina, lamivudina e efavirenz, em camundongos, através do ensaio do cometa e teste do micronúcleo em medula óssea. Os autores observaram que não houve alteração no ensaio do cometa (dano genotóxico) após 24 e 48h de exposição, porém em todas as medicações e doses houve aumento da frequência de MN, sugerindo alterações mutagênicas.

O aumento de MN múltiplos em células da mucosa bucal, foi observado por Lima et al., em 2017, em pessoas adultas portadoras de HIV fazendo uso de TARV, com baixa carga viral, quando comparado ao grupo controle saudável, porém este aumento não foi estatisticamente significativo, já no grupo controle, houve aumento de MN único em relação ao contaminado.

Zizza et al., em 2019 analisaram culturas de linfócitos de 52 pessoas com HIV em uso de TARV, pareadas a um grupo controle saudável, e observaram diferença estatisticamente significativa no aumento de MN do grupo HIV positivo, sendo mais significativo no grupo HIV que tinha alta carga viral.

Lazalde-Ramos et al. (2020) realizaram um estudo utilizando extratos alcoólico e aquoso de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em pacientes adultos com HIV em uso de TARV (efavirenz, emtricitabina e tenofovir). Verificaram aumento no número de células MN, binucleadas e cariorrexe em células da mucosa bucal após 4 meses de tratamento. No grupo que fazia uso da TARV e extratos de alecrim concomitantemente, houve uma redução significativa destes parâmetros, sugerindo o uso desta terapia complementar seria relevante forma de minimizar a instabilidade genômica.

Gutierrez-Sevilla et al., 2021 avaliaram a instabilidade genômica, através do teste do micronúcleo de mucosa bucal, de adultos vivendo com HIV em diferentes tipos de TARV e também sem medicamentos, e observaram aumento de células binucleadas e brotos nucleares em relação ao grupo controle saudável. Entretanto até o presente não há estudos que

demonstrem os efeitos citogeneticos em crianças e adolescentes com HIV bem como em indivíduos não infectados que fazem uso da TARV. Por essa razão, a motivação desse estudo foi justamente responder se os efeitos citogenéticos encontrados nos adultos se configuram de maneira similar nesses grupos populacionais específicos.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, Kharsany AB, Sibeko S, Mlisana KP, Omar Z, Gengiah TN. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *science*. 2010 Sep 3;329(5996):1168-74

Aboulker JP, Babiker A, Chaix ML, Compagnucci A, Darbyshire J, Debré M, Faye A, Giaquinto C, Gibb DM, Harper L, Saïdi Y. Highly active antiretroviral therapy started in infants under 3 months of age: 72-week follow-up for CD4 cell count, viral load and drug resistance outcome. *AIDS (London, England)*. 2004 Jan 1;18(2):237-45.

Ankunda R, Cumber SN, Atuhaire C, Kabanda T, Nkfusai CN, Wirsy FS, Turyakira E. Loss to follow-up and associated maternal factors among HIV-exposed infants at the Mbarara Regional Referral Hospital, Uganda: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases*. 2020 Dec;20(1):1-9.

Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2008 Jan;214(2):231-41.

Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, Tappero JW, Bukusi EA, Cohen CR, Katabira E, Ronald A. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *New England Journal of Medicine*. 2012 Aug 2;367(5):399-410.

Baeten JM, Donnell D, Mugo NR, Ndase P, Thomas KK, Campbell JD, et al. Single-agent tenofovir versus combination emtricitabine plus tenofovir for pre-exposure prophylaxis for HIV-1 acquisition: an update of data from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2014; 14:1055– 1064.

Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *The Lancet*. 1996 Jul 6;348(9019):31-5.

Bazin GR, Gaspar MC, Silva NC, Mendes CD, Oliveira CP, Bastos LS, Cardoso CA. Antiretroviral therapy in HIV-infected children and adolescents: lessons learned in 30 years of the epidemic. *Cadernos de Saúde Pública*. 2014;30:687-702.

Belien JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. 1995 Oct 1;16(10):2395-400.

Blanco D. HIV: Doença crônica. PEBMED. Recuperado de <<https://pebmed.com.br/hiv-doenca-cronica>. 2017>. Acesso em 22/02/2022

Boerma RS, Boender TS, Bussink AP, Calis JC, Bertagnolio S, Rinke de Wit TF, Boele van Hensbroek M, Sigaloff KC. Suboptimal viral suppression rates among HIV-infected children in low- and middle-income countries: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*. 2016 Sep 22;ciw645.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007 Mar 1;28(3):625-31.

Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, Ceppi M. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. Mutation research/reviews in mutation research. 2015 Oct 1;766:20-31.

Borges JM, Pinto JA, Ricas J. Crianças e adolescentes vivendo com HIV/aids: “que doença é essa?”. Reverso. 2015;37(70):67-73.

Brasil. 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016. 149 p.: il. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pt-br/node/57787>> . Acesso em 14/03/2022.

Brasil. 2017. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT IST), 2017. Disponível em:> http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Relatorios/2017/Relatorio_PCDT_PREP_final_atualizadoDEZ2017.pdf> Acesso em: 26/set/2022.

Brasil. 2018a. Ministério da Saúde. Brasília, DF. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. História da aids. Atualizado em: 18/04/ 2018a. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pt-br/centrais-de-conteudos/historia-aids-linha-do-tempo>>. Acesso em: 22/02/2022.

Brasil. 2018b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 218 p.

Brasil. 2018c. Ministério da Saúde. Garantia de tratamento para todos reduz 16% casos e óbitos de aids no país | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Publicado: 27.11.2018 - última modificação: 12.12.2018 Disponível em <http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/garantia-de-tratamento-para-todos-reduz-16-casos-e-obitos-de-aids-no-pais>>. Acesso em 13/03/2022.

Brasil. 2018d. Ministério da Saúde. Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. 2018. Disponível em < <http://www.aids.gov.br/pt-br/node/57787>>. Acesso em 23/02/2022.

Brasil. 2021. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Especial. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2021. 68p | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2021>>. Acesso em: 14/03/2022

Brasil 2022. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2022. Número Especial | Dez. 2022. ISSN: 1517-1159. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2022/hiv-aids/boletim_hiv_aids_-2022_internet_31-01-23.pdf/view> Acesso em: 15 set 2023

Celum C, Baeten J. PrEP for HIV prevention: evidence, global scale-up, and emerging options. *Cell Host & Microbe*. 2020 Apr 8;27(4):502-6.

Chiappini E, Bianconi M, Dalzini A, Petrara MR, Galli L, Giaquinto C, De Rossi A. Accelerated aging in perinatally HIV-infected children: clinical manifestations and pathogenetic mechanisms. *Aging (Albany NY)*. 2018 Nov;10(11):3610.

Choopanya K, Martin M, Suntharasamai P, Sangkum U, Mock PA, Leethochawalit M, Chiamwongpaet S, Kitisin P, Natrujirote P, Kittimunkong S, Chuachoowong R. Antiretroviral prophylaxis for HIV infection in injecting drug users in Bangkok, Thailand (the Bangkok Tenofovir Study): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2013 Jun 15;381(9883):2083-90.

Cohen EA, Subbramanian RA, Göttlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Morphogenesis and Maturation of Retroviruses*. 1996:219-35.

Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1976 Dec 1;41(2-3):321-31.

Czeresnia D. Ações de promoção à saúde e prevenção de doenças: o papel da ANS. Documentos técnicos de apoio ao Fórum. 2003:211.

Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *Bmj*. 2009 Jan 26;338.

Deen KC, McDougal JS, Inacker R, Folena-Wasserman G, Arthos J, Rosenberg J, Maddon PJ, Axel R, Sweet RW. Soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature*. 1988 Jan 7;331(6151):82-4.

Ellegård R. Effects of Complement Opsonization of HIV on Dendritic Cells: and Implications for the Immune Response. Linköping University Electronic Press; 2018 Sep 28.

FDA Guidance Document. Guidance for industry antiretroviral drugs using plasma HIV RNA measurements — clinical considerations for accelerated and traditional approval. Disponível em: ><http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070968.pdf>> Acesso em 13/jul/2023.

FDA. Food and Drug Administration. Truvada. Disponível em: >https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/21752s002lbl.pdf< Acesso em: 01 nov 2022.

Fehrehbach, M.J.; Bath-Balogh M. Mucosa oral. In: Anatomia, Histologia E Embriologia Dos Dentes E. Editora Manole Ltda; 2008. p. 105-133.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2007 May 1;2(5):1084-104.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011 Jan 1;26(1):125-32.

Fonner VA, Dalglish SL, Kennedy CE, Baggaley R, O'reilly KR, Koechlin FM, Rodolph M, Hodges-Mameletzis I, Grant RM. Effectiveness and safety of oral HIV preexposure prophylaxis for all populations. *AIDS (London, England)*. 2016 Jul 7;30(12):1973.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry*. 1998 Jul;67(1):1-25.

Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*. 1985 Jan 11;227(4683):173-7.

Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, Goicochea P, Casapía M, Guanira-Carranza JV, Ramirez-Cardich ME, Montoya-Herrera O. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *New England Journal of Medicine*. 2010 Dec 30;363(27):2587-99.

Grant RM, Anderson PL, McMahan V, Liu A, Amico KR, Mehrotra M, Hosek S, Mosquera C, Casapia M, Montoya O, Buchbinder S. Uptake of pre-exposure prophylaxis, sexual practices, and HIV incidence in men and transgender women who have sex with men: a cohort study. *The Lancet infectious diseases*. 2014 Sep 1;14(9):820-9.

Guaraldi G, Palella Jr FJ. Clinical implications of aging with HIV infection: perspectives and the future medical care agenda. *Aids*. 2017 Jun 1;31:S129-35.

Gulick RM. AIDS Clinical Trials Group Study A5095 Team. Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1850-61.

Gutiérrez-Sevilla JE, Cárdenas-Bedoya J, Escoto-Delgadillo M, Zúñiga-González GM, Pérez-Ríos AM, Gomez-Meda BC, Gonzalez-Enriquez GV, Figarola-Centurión I, Chavarria-Avila E, Torres- Mendoza BM. Genomic instability in people living with HIV. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2021 May 1;865:503336.

Havens PL, Gibb DM. Increasing antiretroviral drug access for children with HIV infection. *Pediatrics* 2007; 119:838–45.

HHS Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of Children Living with HIV. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Atualizado: 14/04/2020. Disponível em < <http://aidsinfo.nih.gov/content/files/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>. > Acesso: 29/03/2022.

Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):51-6.

Holmes D. FDA paves the way for pre-exposure HIV prophylaxis. *The Lancet*. 2012 Jul 28;380(9839):325.

Hope, T. J. (1999). The ins and outs of HIV Rev. *Archives of biochemistry and biophysics*, 365(2), 186-191.

Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Kochetkov SN, Starodubova ES, Bartosch B, Isaguliant MG. Oxidative stress during HIV infection: mechanisms and consequences. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.

Katumba RG, Sensoy Bahar O, Johnson KJ, Ssewamala FM. Cancer in Youth Living With HIV (YLWHIV): A Narrative Review of the Access to Oncological Services Among YLWHIV and the Role of Economic Strengthening in Child Health. *Frontiers in Public Health*. 2020 Aug 14;8:409.

Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annual review of biochemistry*. 1994 Jul;63(1):133-73.

Knasmüller S, Fenech M, editors. The micronucleus assay in toxicology. Royal Society of Chemistry; 2019 Jul 18.

Lima CF, Alves MG, Furtado JJ, Marcucci M, Balducci I, Almeida JD. Effect of HIV infection in the micronuclei frequency on the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2017 Sep;46(8):644-8.

Lu M, Kim PS. A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1997 Dec 1;15(3):465-71.

Mantovani MS, Felicidade I, de Lima LVA, Garcia AL, Matzenbacher CA, Dalberto D, da Silva FR, Picada JN, de Souza MR, Rohr P, da Silva J. Teste de micronúcleos: in vitro e in vivo. In: Salvadori DMF, Takahashi CS, Grisolia CK, Santos RA. Da toxicogenética à toxicogenômica. Rio de Janeiro: Ed Atheneu, 2021. p.139-168.

Martin M, Vanichseni S, Suntharasamai P, Sangkum U, Mock PA, Gvetadze RJ, et al. Renal function of participants in the Bangkok tenofovir study – Thailand, 2005-2012. *Clin Infect Dis* 2014; 59:716–724.

Mayer KH, Molina JM, Thompson MA, Anderson PL, Mounzer KC, De Wet JJ, DeJesus E, Jessen H, Grant RM, Ruane PJ, Wong P. Emtricitabine and tenofovir alafenamide vs emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate for HIV pre-exposure prophylaxis (DISCOVER): primary results from a randomised, double-blind, multicentre, active-controlled, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2020 Jul 25;396(10246):239-54.

McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, Sullivan AK, Clarke A, Reeves I, Schembri G, Mackie N. Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *The Lancet*. 2016 Jan 2;387(10013):53-60.

Mendes, ICM. AIDS 2022: OMS atualiza guidelines da profilaxia pré-exposição. Congresso. 30/jul/2022. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/ias-2022-novidades-dos-guidelines-da-oms-prep/>> Acesso em: 19/set/2022.

Mirembe BG, Kelly CW, Mgodhi N, Greenspan S, Dai JY, Mayo A, et al. Bone mineral density changes among young, healthy African women receiving oral tenofovir for HIV pre-exposure prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; 71:287–294.

Mishra S, Tiwari AK, Mahdi AA. Impact of heavy metal carcinogens on human health. *Biomedical applications of metals*. 2018:277-95.

Molina JM, Capitant C, Spire B, Pialoux G, Chidiac C, Charreau I, Delfraissy JF. On demand PrEP with oral TDF-FTC in MSM: results of the ANRS Ipergay trial. *InConference on retroviruses and opportunistic infections* 2015 Feb 23 (Vol. 2015).

Moraes Filho AV, Carvalho CD, Carneiro CC, Vale CR, Lima DC, Carvalho WF, Vieira TB, Silva DD, Cunha KS, Chen-Chen L. Genotoxic and cytotoxic effects of antiretroviral combinations in mice bone marrow. *PLoS One*. 2016 Nov 2;11(11):e0165706.

Morimoto HK, Simão AN, de Almeida ER, Ueda LT, Oliveira SR, de Oliveira NB, Petenucci DL, Panis C, Cecchini R, Dichi I, Reiche EM. Role of metabolic syndrome and antiretroviral therapy in adiponectin levels and oxidative stress in HIV-1 infected patients. *Nutrition*. 2014 Nov 1;30(11- 12):1324-30.

Nance RM, Delaney JC, Simoni JM, Wilson IB, Mayer KH, Whitney BM, Aunon FM, Safren SA, Mugavero MJ, Mathews WC, Christopoulos KA. HIV viral suppression trends over time among HIV-infected patients receiving care in the United States, 1997 to 2015: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2018 Sep 18;169(6):376-84.

Nanci, H.; Ten Cate's Oral Histology - Development, Structure, and Function. 9o Ed., p. 260-87, 2017

Olivero OA. Relevance of experimental models for investigation of genotoxicity induced by antiretroviral therapy during human pregnancy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008 Mar 1;658(3):184-90.

Olivero OA, Torres LR, Gorjifard S, Momot D, Marrogi E, Divi RL, Liu Y, Woodward RA, Sowers MJ, Poirier MC. Perinatal exposure of patas monkeys to antiretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity persistent for up to 3 years of age. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Jul 15;208(2):244-8.

PAHO. 2022. Pan American Health Organization. Oral Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP) of HIV infection - eLearning tool for clinicians. Revisado em: 11 jul 2022. Disponível em: <<https://www.campusvirtualsp.org/en/course/oral-pre-exposure-prophylaxis-prep-hiv-infection-elearning-tool-clinicians-2021>> Acesso em: 26 out 2022.

Pathai S, Bajillan H, Landay AL, High KP. Is HIV a model of accelerated or accentuated aging?. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2014 Jul 1;69(7):833-42.

Pereira GF, Kim A, Jalil EM, Fonseca FF, Shepherd BE, Veloso VG, Rick F, Ribeiro R, Pimenta MC, Beber A, Corrêa RG. Dolutegravir and pregnancy outcomes in women on antiretroviral therapy in Brazil: a retrospective national cohort study. *The Lancet HIV*. 2021 Jan 1;8(1):e33-41.

Peçanha EP, Antunes OA, Tanuri A. Pharmacological strategies for anti-HIV therapy. *Química Nova*. 2002;25:1108-16.

Pinto Neto LF, Perini FD, Aragón MG, Freitas MA, Miranda AE. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo HIV em adolescentes e adultos. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2021 Mar 15;30.

Portilla-Tamarit J, Reus S, Portilla I, Fuster Ruiz-de-Apodaca MJ, Portilla J. Impact of advanced HIV disease on quality of life and mortality in the era of combined antiretroviral treatment. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Feb 11;10(4):716.

Ribeiro LR, Marques EK. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, organizadores. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA. 2003:21-7.

da Rosa MC. Patogênese do HIV—características do vírus e transmissão materno-infantil. *RBAC*. 2016;48(4):301-6.

Sigaloff KCE, Calis JCJ, Geelen SP, van Vugt M, Rinke de Wit TF. HIV-1-resistance-associated mutations after failure of first-line antiretroviral treatment among children in resource-poor regions: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2011; 11:769–79.

Singh E, Naidu G, Davies MA, Bohlius J. HIV-associated malignancies in children. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2017 Jan;12(1):77.

Solomon MM, Lama JR, Glidden DV, Mulligan K, McMahan V, Liu AY, et al. Changes in renal function associated with oral emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate use for HIV pre-exposure prophylaxis. *AIDS* 2014; 28:851–859

Start Free. Stay Free. AIDS Free. (unaids.org). 2021. Disponível em <<https://free.unaids.org/>> Acesso em: 02/03/2022

Stich HF, Stich W, Rosin MP. The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic and Applied Mutagenesis: With Special Reference to Agricultural Chemicals in Developing Countries*. 1985:337-42.

Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer research*. 2006 Jan 15;66(2):627-31.

Thigpen MC, Kebaabetswe PM, Paxton LA, Smith DK, Rose CE, Segolodi TM, Henderson FL, Pathak SR, Soud FA, Chillag KL, Mutanhaurwa R. Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. *New England Journal of Medicine*. 2012 Aug 2;367(5):423-34

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009 Jun;4(6):825.

Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):69-76.

Tobin NH, Aldrovandi GM. Immunology of pediatric HIV infection. *Immunological reviews*. 2013 Jul;254(1):143-69.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1992 Feb 1;271(1):69-77.

Townsend CL, Byrne L, Cortina-Borja M, Thorne C, de Ruiter A, Lyall H, Taylor GP, Peckham CS, Tookey PA. Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000–2011. *Aids*. 2014 Apr 24;28(7):1049-57.

Tsai CC, Emau P, Follis KE, Beck TW, Benveniste RE, Bischofberger N, Lifson JD, Morton WR. Effectiveness of postinoculation (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl) adenine treatment for prevention of persistent simian immunodeficiency virus SIV_{mac} infection depends critically on timing of initiation and duration of treatment. *Journal of virology*. 1998 May 1;72(5):4265-73.

Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, Faye A, Delaugerre C, Blanche S, Warszawski J, ANRS French Perinatal Cohort (ANRS CO1/CO11). Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load < 500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clinical infectious diseases*. 2010 Feb 15;50(4):585-96.

UNAIDS. 2021a. Relatório Informativo Dia Mundial da AIDS 2021. Disponível em <https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2022/02/2021_12_01_UNAIDS_2021_FactSheet_DadosTB_Traduzido.pdf> Acesso em 23/02/2022.

UNAIDS. 2021b. Novo relatório mostra desigualdade no acesso à prevenção e tratamento do HIV para crianças - UNAIDS Brasil. Disponível em: <<https://unaids.org.br/2021/07/relatorio-mostra-desigualdade-no-acesso-a-tratamento-do-hiv/>>. Acesso em 23/02/2022

UNAIDS. 2022a. Estatísticas - UNAIDS Brasil. Disponível em < <https://unaids.org.br/estatisticas/>> Acesso em 03/out/2022

UNAIDS. 2022b IN DANGER: UNAIDS Global AIDS Update 2022. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2022-global-aids-update_en.pdf > Acesso em 03/out/2022

Vaishnav YN, Wong-Staal F. The biochemistry of AIDS. *Annual review of biochemistry*. 1991 Jul;60(1):577-630.

Wassner C, Bradley N, Lee Y. A review and clinical understanding of tenofovir: tenofovir disoproxil fumarate versus tenofovir alafenamide. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)*. 2020 Apr 15;19:2325958220919231.

WHO. 2021. World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. Geneva: World Health Organization; 2021. Disponível em: ><https://www.who.int/publications/i/item/9789240031593><. Acesso em: 26/sep/2022

WHO. 2022. World Health Organization. Global HIV Programme. c2022. Pre-exposure prophylaxis (PrEP). Disponível em: ><https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/prevention/pre-exposure-prophylaxis><. Acesso em: 13/ set/ 2022

Williams PL, Yildirim C, Chadwick EG, Van Dyke RB, Smith R, Correia KF, DiPerna A, Seage GR, Hazra R, Crowell CS. Association of maternal antiretroviral use with microcephaly in children who are HIV-exposed but uninfected (SMARTT): a prospective cohort study. *The lancet HIV*. 2020 Jan 1;7(1):e49-58.

Witt KL, Cunningham CK, Patterson KB, Kissling GE, Dertinger SD, Livingston E, Bishop JB. Elevated frequencies of micronucleated erythrocytes in infants exposed to zidovudine in utero and postpartum to prevent mother-to-child transmission of HIV. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2007 Apr;48(3-4):322-9.

Zash R, Holmes L, Diseko M, Jacobson DL, Brummel S, Mayondi G, Isaacson A, Davey S, Mabuta J, Mmalane M, Gaolathe T. Neural-tube defects and antiretroviral treatment regimens in Botswana. *New England Journal of Medicine*. 2019 Aug 29;381(9):827-40.

Zizza A, Grima P, Andreassi MG, Tumolo MR, Borghini A, De Donno A, Negro P, Guido M. HIV infection and frequency of micronucleus in human peripheral blood cells. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2019 Sep;60(3):E191.

Cytogenetic changes in oral mucosal cells of human immunodeficiency virus-infected children and adolescents undergoing antiretroviral treatment

Maria Esther Suarez Alpire¹ , Daniel Vitor de Souza¹ , Carolina Marquez da Costa Brites Masutti² , Marcos Montani Caseiro³ , Daniel Araki Ribeiro^{1*} 

¹Universidade Federal de São Paulo, Institute of Health and Society, Department of Biosciences – Santos (SP), Brazil.

²Serviço de Assistência Especializada Infantil, Specialized Care Service, Pediatrics Section – Santos (SP), Brazil.

³Centro Universitario Lusiada – Santos (SP), Brazil.

*Corresponding author: daribeiro@unifesp.br

Conflicts of interest: the authors declare there is no conflicts of interest. Funding: The authors acknowledge that they received research grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant Number #001) for productivity fellowship.

Received on July 03, 2023. Accepted on July 23, 2023.

SUMMARY

OBJECTIVE: The objective of this study was to evaluate possible cytogenetic changes in children and adolescents with human immunodeficiency virus on antiretroviral therapy, through the micronucleus test in oral mucosa.

METHODS: This was a prospective study consisted of 40 individuals, of whom 21 comprised the human immunodeficiency virus group and 19 comprised the control group. Children and adolescents with human immunodeficiency virus were enrolled. The inclusion criteria were <18 years old and consent in participating in the study. The exclusion criteria were the presence of numerous systemic comorbidities, oral lesions, the habit of smoking, alcohol consumption, and X-rays or CT scans taken within 15 days prior to sample collection. A gentle scraping was performed on the inner portion of the jugal mucosa on both sides. A total of 2,000 cells per slide were analyzed for the determination of mutagenicity parameters as follows: micronuclei, binucleation, and nuclear buds. For measuring cytotoxicity, the following metanuclear changes were evaluated: pyknosis, karyolysis, and karyorrhexis, in a double-blind manner. The repair index was also evaluated in this setting.

RESULTS: The human immunodeficiency virus group showed high frequencies of micronuclei ($p=0.05$), binucleated cells ($p=0.001$), and nuclear buds ($p=0.03$). In the cytotoxicity parameters, represented by the cell death phases, there was an increase with statistical difference ($p\leq 0.05$) in the karyorrhexis frequency ($p=0.05$). Additionally, repair index was decreased in the human immunodeficiency virus group.

CONCLUSION: These results indicate that human immunodeficiency virus -infected individuals undergoing antiretroviral therapy have cytogenetic changes in oral mucosal cells.

KEYWORDS: Child. DNA damage. HIV. Micronucleus tests. Mouth mucosa.

INTRODUCTION

Currently, 79 million people have been infected worldwide with the human immunodeficiency virus (HIV), whose predilection for immune system cells, which induces acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), has been responsible for the death of 39 million people since the beginning of the epidemic¹. Still, it is responsible for 88% of contaminations of children up to 13 years. From this age, the main route of contamination is sexual. During the past 10 years, there has been an increase of 64.9% in young males aged 15–19 years, while there has been a significant decrease among women in this age group². Antiretroviral therapy (ART), started in the late 1980s, has been constantly evolving, acting especially on the replication of the virus in several stages and combining different classes of antiretrovirals. Antiretroviral drugs are classified according to their mechanism of action. There are more than 25 drugs divided into six types: nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors, fusion inhibitors, integrase inhibitors, and entry inhibitors. In fact, ART has shown a reduction in mortality and a significant increase in survival. It also shows an improvement in the quality of life and suppression of viral load in many cases, which decreases the chance of transmission, preventing vertical transmission^{3,4}. In 2004, a study reported that only 26% of children achieved complete viral suppression with 72 weeks of ART⁵, in contrast to the percentage observed by Gulick et al.⁶ whose remission in adults was 89% after 48 weeks of ART treatment. In the same study, Aboulker et al.⁷ demonstrated 30% of selection of HIV resistance mutations in children, leading to virological failure, and emphasized the importance of early initiation of ART in children. In Europe and the United States, the infant mortality rate fell between 80 and 90% after the introduction of ART, and although it is considered a chronic disease at present, it is estimated that the survival of these children is 30 times lower than a healthy child⁸. However, metabolic, neurological, cardiovascular, renal, and cancer disorders are the complications not related to AIDS, but related to the set of aging conditions mediated by HIV, or even by the persistent inflammatory immune process, even if under treatment^{9,10}.

Micronuclei (MN) are small fragments of nuclei (DNA), present in the cytoplasm of nucleated cells, and are used as a sensitive biomarker of chromosomal damage, genome instability, and mutagenicity^{11,12}. MN originate during cell division, from a damage that exceeds the repair capacity, which can lead to the loss of an entire chromosome (aneugenic event), or a chromosome fragment (clastogenic event), and that in the final phase of cell division, telophase, receive a nuclear envelope, giving a similar appearance to the nucleus with a smaller size in relation to the main nucleus¹³. In the 1980s, Stich and Rosin proposed a modification capable of identifying such MN in exfoliated cells of the oral mucosa¹⁴, with the advantage of being a less invasive test and easy to perform in relation to other genetic tests. This methodology has since proved to be an important biomarker of effect, versatile, and low cost, which focuses on prevention, predicting an interaction between a chemical, physical, or biological substance, with biological receptors, ideally when there is no disease. It should be noted that these are not diagnostic tests¹⁵, but internationally recognized tests, which are considered robust, simple, and amenable to automation, with established regulatory guidelines¹⁶. Based on the information presented, the objective of this study was to evaluate possible cytogenetic changes in children and adolescents with HIV on ART, through the micronucleus test in oral mucosa.

METHODS

Casuistics

The study was approved by the Institutional Human Ethics Committee from Federal University of São Paulo, under the protocol 0485/2019. All the legal guardians of participants signed the informed consent form and participants signed the assent form.

This prospective study consisted of 40 individuals; of whom 21 comprised the HIV group and 19 comprised the control group. All participants received detailed information about the project and the consent form was delivered to children and adolescents (<18 years), after being signed by their respective guardians. Children and adolescents (aged from 0 to 18 years), with HIV were enrolled, who were regularly monitored at the Specialized Child Care Service (SAE infantil) in the city of Santos – SP, Brazil, and whose total was 21 people from August to December, 2019. The inclusion criteria were <18 years old and consent in participating in the study. The exclusion criteria were the presence of systemic comorbidities, oral lesions, the habit of smoking, alcohol consumption, and X-rays or CT scans taken within 15 days prior to sample collection. A single examiner, a dentist, collected, stained, and examined the unidentified samples. The control group was enrolled by direct approach randomly in public places in the

city of Santos – SP. Exclusion criteria were similar to that of HIV group.

Micronucleus test in oral cells

The buccal mucosal MN test followed the protocol described by Belien et al.¹⁷ With the aid of a wooden spatula previously moistened in saline solution, a gentle scraping was performed on the inner portion of the jugal mucosa on both sides, for approximately 10 times each side. The material was deposited on a clean and dry histological slide. The slides were stained by Feulgen-Fast-Green technique. A total of 2,000 cells per slide were analyzed, at 1,000 $\times$ magnification, for the determination of MN, binucleation (BN), and nuclear buds (NB), and cytotoxicity parameters such as pyknosis (PK), karyolysis (KL), and karyorrhexis (KR) in a double-blind manner. The correct identification of such parameters was established by Bolognesi et al.¹⁸. For this purpose, the following criteria were established for the correct identification of cytogenetic changes of MN: (1) intact main nucleus and cytoplasm; (2) one-third diameter of the main nucleus; (3) similar stain and texture of the main nucleus; and (4) MN in the same focus as that in the main nucleus; KR: the nucleus may also exhibit extensive fragmentation indicative of advanced nuclear fragmentation; BN: two main nuclei within a single cell and the nuclei are of similar size and staining intensity; NB: the main nucleus has a sharp constriction forming a bud of nuclear material being attached to the main nucleus by a narrow or wide nucleoplasmic bridge; PK: the nucleus is small and shrunken with a diameter that is approximately one-third of that in a fully differentiated cell being uniformly and intensely stained; and KL: they do not have a DNA-containing nucleus or other structures that stain with Feulgen.

The repair index (RI), proposed by Ramirez and Saldanha¹⁵, represented by the formula $RI = (KL + KR) / (MN + NB)$, was also evaluated in this setting. Statistical analysis

All data were submitted to the normalization using Kolmogorov-Smirnov test. After that, non-parametric data were confirmed by all data collected in this setting. The test used to evaluate the metanuclear alterations and DNA RI between the control group and HIV was the non-parametric Mann-Whitney U test. The statistical significance level was set at 5%. The statistical analysis was conducted by the Bio Stat software (version 5.0, Maringá-Brazil).

RESULTS

In the HIV group, there was an exclusion of only one transsexual teenager, who was a smoker and also used other drugs such as LSD ((lysergic acid diethylamide) and ecstasy (3,4-meth-

ylenedioxy-methamphetamine). The distribution was 9 boys and 11 girls, all of whom reported good eating habits including fruits, except the 4-month-old baby who used milk formula. Only one adolescent reported occasional use of marijuana and eight reported the use of mouthwash. Only 4 cases were in treatment between 1 and 3 years, and the other 16 cases were in treatment from the beginning of life. Regarding the control group, all participants were included and the distribution was 8 boys and 11 girls, of whom 6 reported using mouthwash and none were using any medication. The groups are represented in Table 1.

Table 1. Demographic characteristics of study participants.

Parameters	Control group (n=19)	HIV group (n=21)
Mean age	6.9 (4.9)	13.1 (4.72)
Gender	8/11 M/F	9/11 M/F
Time of therapy (years)	–	9.3+6.1
Time of infection (years)	–	9.4+6
Educational level		
Primary level	19	21
Secondary level	0	0
Ethnicity		
Black	0	0
White	14	11
Mixed	5	10
Use of mouthwash	6	8
Use of illicit drugs	0	1

The HIV group presented an increase in statistical difference ($p \leq 0.05$) in relation to the control group in the parameters of mutagenicity, the frequency of MN ($p=0.05$), BN ($p=0.001$), and NB ($p=0.03$), as shown in Table 2.

In the cytotoxicity parameters, there was an increase in statistical difference in the frequency of KR ($p=0.05$). KL and PK showed no significant increase ($p > 0.05$), as shown in Table 2. Finally, the RI shown in Table 2 suggests a higher repair capacity in the control group when compared to the HIV group.

Table 2. Total number [Median (Min–Max)] of oral cells presenting genotoxicity, cytotoxicity, and DNA repair index in children infected with human immunodeficiency virus undergoing antiretroviral therapy

Groups	Normal	Karyolysis (KL)	Karyorrhexis (KR)	Pyknosis (PK)	Micronucleus (MN)	Binucleation (BN)	Nuclear bud (NB)	(KL+KR)/(MN+NB)
Control (n=19)	1,633 (1,556–1,748)	199 (50–328)	21 (6–34)	138 (64–285)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	227 (31–309)
HIV (n=20)	1,618 (1,450–1,704)	220.5 (175–266)	43.5 (34–53)*	122.5 (63–182)	1.5 (1–2)*	1.5 (1–2)*	1,5 (1–4)	91 (33–309)*

*p≤0.05 when compared to control.

DISCUSSION

Our results demonstrated that children infected with HIV undergoing ART therapy possess cytogenetic damage in the oral mucosa as depicted by increasing mutagenicity, cytotoxicity, and low DNA repair capacity. It is important to highlight that the success of ART is undeniable in relation to the higher life expectancy and quality of life, giving chronicity status to the infection caused by HIV. However, the side effects of ART are well documented and others are still being studied. There are 12 types of drugs used in this HIV group, in different conjugations, always using a cocktail of at least 3 drugs per individual, according to the guidelines commonly used for the management of HIV infection. Nucleosides reverse transcriptase inhibitor drugs are essential constituents that make up ART, and patients in general receive two drugs of this class in combination with a third active drug of another class¹⁹. This protocol may change according to the body response, from the viral load and clinical response, and which can be influenced by both virus mutations and individual interruptions or adverse reactions in treatment. In a study with mice, alterations such as hepatocellular adenomas, carcinomas, and pulmonary alveolar/bronchiolar adenomas were reported with the use of tenofovir and efavirenz²⁰, but this risk with tenofovir and entecavir in humans was not evident in the recent review published by Tseng et al.²¹ Nephrotoxic effects, liver disease, and bone hypomineralization have been described in nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs¹⁹. In this study, the HIV group presented statistical difference in all mutagenicity parameters (MN, NB, and BN), in relation to the control group of healthy children and adolescents submitted to ART.

Regarding cytotoxicity, parameters were also altered, specifically in KR, which may suggest that the organism is constantly being challenged, by the mechanisms of cell cycle control and tissue death. We can still observe that even with an increase in the rate of cell death, which could mask the presence of mutagenic alterations, MN, NB, and BNs were increased in the HIV group, which suggests a high mutagenicity detectable by the proposed methodology. These

results were confirmed by the decrease in the efficiency of the repair system in the experimental group. Despite few studies involving children, in 2007, Witt et al.²² evaluated the chromosomal damage of infants exposed to ART by transplacental route and observed increased MN in erythrocytes in these infants born to seropositive mothers, who used zidovudine during pregnancy, and were also prophylactically medicated for 6 weeks after birth. The genotoxicity and mutagenicity of this drug had already been described in other studies in vitro and in animal models²³. In 2013, Olivero et al.²⁴ observed that the use of ART, with reverse transcriptase inhibitor drugs (zidovudine, lamivudine, abacavir, and nevirapine) in the offspring of pregnant monkeys not carrying HIV, which were medicated during pregnancy and after birth, revealed genomic instability and mutagenic effects that persisted for 3 years (final year of research). Moraes Filho et al.²⁵ evaluated that cytotoxicity and genotoxicity of different concentrations of ART composed of tenofovir, lamivudine, and zidovudine, lamivudine, and efavirenz, in mice, through the comet assay and bone marrow micronucleus test. The increase of MN in buccal mucosal cells was observed by Lima et al.²⁶, in adults with HIV using ART, with low viral load. Our results are in line with the studies identified above that evaluated the effects on rodents and adult individuals.

This study has some limitations. First, it was not possible to evaluate to what extent ART only is able to induce cytogenetic damage in oral cells. Second, the lack of previous research studies on the topic compromise an in-depth discussion regarding the data. Taken together, our results indicate that children infected with HIV and submitted to ART demonstrate genomic damage and cytotoxicity in buccal cells. However, further studies are necessary to elucidate the issue.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The project was approved by the Research Ethics Committee of UNIFESP (Federal University of São Paulo) under protocol number #3.461.911.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Data sharing are available upon request.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MESA: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. MMC: Conceptualization, Data curation, Supervision, Writing – original draft. DVS: Methodology, Software, Validation, Visualization. DAR: Conceptualization, Formal Analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. CMCBM: Data curation, Investigation, Writing – original draft.

REFERENCES

1. Borges JMC, Pinto JÁ, Ricas J. Crianças e adolescentes vivendo com HIV/aids: “que doença é essa?”. *Reverso*, Belo Horizonte 37:67-73. [cited on Feb 23, 2022] Available from: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-73952015000200009&lng=pt&nrm=iso
2. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. boletim epidemiológico especial. Dez.2020. 68p. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2021 | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. [cited on Mar 03, 2022] Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2021>
3. Nance RM, Delaney JAC, Simoni JM, Wilson IB, Mayer KH, Whitney BM, et al. HIV viral suppression trends over time among hiv-infected patients receiving care in the United States, 1997 to 2015: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2018;169(6):376-84. <https://doi.org/10.7326/M17-2242>
4. Portilla-Tamarit J, Reus S, Portilla I, Fuster Ruiz-de-Apodaca MJ, Portilla J. Impact of advanced HIV disease on quality of life and mortality in the era of combined antiretroviral treatment. *J Clin Med*. 2021;10(4):716. <https://doi.org/10.3390/jcm10040716>
5. Aboulker JP, Babiker A, Chaix ML, Compagnucci A, Darbyshire J, Debré M, et al. Highly active antiretroviral therapy started in infants under 3 months of age: 72-week follow-up for CD4 cell count, viral load and drug resistance outcome. *AIDS*. 2004;18(2):237-45. <https://doi.org/10.1097/00002030-200401230-00013>
6. Gulick RM, Ribbaudo HJ, Shikuma CM, Lustgarten S, Squires KE, Meyer WA, et al. Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1850-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031772>
7. Chiappini E, Bianconi M, Dalzini A, Petrara MR, Galli L, Giaquinto C, et al. Accelerated aging in perinatally HIV-infected children: clinical manifestations and pathogenetic mechanisms. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(11):3610-25. <https://doi.org/10.18632/aging.101622>
8. Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ*. 2009;338:a3172. <https://doi.org/10.1136/bmj.a3172>
9. Guaraldi G, Palella FJ. Clinical implications of aging with HIV infection: perspectives and the future medical care agenda. *AIDS*. 2017;31 Suppl 2:S129-35. <https://doi.org/10.1097/>

QAD.0000000000001478

10. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):625-31. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl1177>
11. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
12. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
13. Stich HF, Stich W, Rosin MP. The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci*. 1985;34:337-42. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4976-1_22
14. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: a systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;766:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.002>
15. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res*. 2002;1(3):246-60. PMID: 14963832
16. Knasmüller S, Fenech M. The micronucleus assay in toxicology. *Royal Soc Chem*. 2017;31 Suppl 2: S105-19.
17. Beliën JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. 1995;16(10):2395-400. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.10.2395>
18. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013;753(2):100-13. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>
19. Wassner C, Bradley N, Lee Y. A review and clinical understanding of tenofovir: tenofovir disoproxil fumarate versus tenofovir alafenamide. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2020;19:2325958220919231. <https://doi.org/10.1177/2325958220919231>
20. Wu KM, Powley MW, Ghantous H. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. *Int J Toxicol*. 2012;31(3):211-21. <https://doi.org/10.1177/1091581812439585>
21. Tseng CH, Hsu YC, Chen TH, Ji F, Chen IS, Tsai YN, et al. Hepatocellular carcinoma incidence with tenofovir versus entecavir in chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(12):1039-52. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30249-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30249-1)
22. Witt KL, Cunningham CK, Patterson KB, Kissling GE, Dertinger SD, Livingston E, et al. Elevated frequencies of micronucleated erythrocytes in infants exposed to zidovudine in utero and postpartum to prevent mother-to-child transmission of HIV. *Environ Mol Mutagen*. 2007;48(3-4):322-9. <https://doi.org/10.1002/em.20266>
23. Olivero OA, Torres LR, Gorjifard S, Momot D, Marrogi E, Divi RL, et al. Perinatal exposure of patas monkeys to antiretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity

persistent for up to 3 years of age. *J Infect Dis.* 2013;208(2):244-8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit146>

24. Moraes Filho AV, Carvalho CJ, Carneiro CC, Vale CR, Lima DC, Carvalho WF, et al. Genotoxic and cytotoxic effects of antiretroviral combinations in mice bone marrow. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165706>

25. Lima CF, Alves MGO, Furtado JJD, Marcucci M, Balducci I, Almeida JD. Effect of HIV infection in the micronuclei frequency on the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(8):644-8. <https://doi.org/10.1111/jop.12527>

26. Gutiérrez-Sevilla JE, Cárdenas-Bedoya J, Escoto-Delgadillo M, Zúñiga-González GM, Pérez-Ríos AM, Gómez-Meda BC, et al. Genomic instability in people living with HIV. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2021;865:503336. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503336>

Artigo aceito para publicação na revista

Journal of The Brazilian Medical Association

<https://doi.org/10.1590/1806-9282.20230961>

Rev Assoc Med Bras. 2023;69(11):e20230961

Cytogenetic changes in oral mucosa cells from individuals submitted to oral human immunodeficiency virus pre exposure prophylaxis -use

Short title: Micronucleus assay, and pre-exposure prophylaxis

Maria Esther Suarez Alpire¹, Daniel Vitor de Souza¹, Carolina Marquez da Costa Brites Masutti², Marcos Montani Caseiro³, Daniel Araki Ribeiro^{1*}

¹Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Saúde e Sociedade, Departamento de Biociências (SP), Brazil.

²SAE Infantil, Serviço de Atendimento Especializado, Seção de Pediatria (SP), Brazil.

³Centro Universitario Lusiada– Santos, Brazil.

*Corresponding author: daribeiro@unifesp.br

Conflicts of interest: the authors declare there is no conflicts of interest. Funding: The authors acknowledge the research grants received from Conselho Nacional de

Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (Grant Number 001) for productivity fellowship

Received on August 15, 2023. Accepted on August 15, 2023.

SUMMARY

OBJECTIVE: The objective of this study was to evaluate cytogenetic changes in individuals submitted to oral human immunodeficiency virus pre-exposure prophylaxis-use, through the micronucleus test in oral mucosa.

METHODS: This study consisted of 37 individuals, of whom 17 comprised the pre-exposure prophylaxis-group and 20 comprised the control group. A total of 2,000 cells per slide were analyzed for the determination of micronuclei, binucleation, nuclear buds, and cytotoxicity parameters: pyknosis, karyolysis, and karyorrhexis (KR), in a double-blind manner. The repair index was also evaluated in this setting.

RESULTS: In the mutagenicity parameters, the pre-exposure prophylaxis group showed increased frequencies of micronuclei ($p=0.0001$), binucleation ($p=0.001$), and nuclear buds($p=0.07$). Regarding the cytotoxicity parameters, there was an increase with a statistical difference ($p\leq 0.05$) in the karyorrhexis frequency ($p=0.001$). Additionally, the repair system efficiency decreased in the pre-exposure prophylaxis group.

CONCLUSION: These results indicate that individuals undergoing pre-exposure prophylaxis use have geno- and cytotoxicity in oral mucosal cells.

KEYWORDS: Antirretroviral therapy;. DNA damage;. Micronucleus tests; Mouth mucosa.

INTRODUCTION

The different existing methods to avoid contamination by the human immunodeficiency virus (HIV) have not yet been enough to eradicate the disease. Since its form of transmission was discovered, through secretions, such as vaginal secretions, sperm, blood, and breast milk, the incessant recommendations before the use of mechanical barrier (condoms), the non-sharing of needles, the decrease of high-risk behaviors, especially for alcohol and drug users, regular testing for HIV, prompt treatment of other sexually transmitted infections, and prevention of transmission by HIV-positive individuals with regular use of antiretroviral therapy (ART), have been part of the strategy to minimize the spread of acquired immunodeficiency Syndrome.

Since 2016, the World Health Organization (WHO) has published a guide of

recommendations closely related to AIDS, and has oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) as part of the combined prevention strategy (biomedical and behavioral) to HIV infection for people at high risk². PrEP consists of the continuous use of antiretroviral drugs in HIV-negative people to reduce the risk of acquiring HIV infection¹. The medication initially offered included oral tenofovir, either alone or in combination with emtricitabine, both being nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In 2021, the use of the vaginal ring with dapivirine was another option for women at risk, and in 2022, the injectable use of long-acting cabotegravir was recently added to the prophylactic medications³. Several studies have demonstrated that the treatment with PrEP reduces HIV infection^{4,5}. For example, Tsai et al.⁶, studied the use of the antiretroviral tenofovir in monkeys (*Macaca fascicularis*) inoculated with HIV, and observed that, when treated in the first 24 h after infection, for 28 days, they did not show viral replication after interruption of treatment. Grant et al.⁷, in their study on 2,499 participants from 6 countries, observed a 44% decrease in HIV infection in individuals who made the prophylactic use of tenofovir associated with emtricitabine. In the same year, Abdool Karim et al.⁸, observed that the use of 1% tenofovir vaginal gel reduced HIV infection between 39 and 54% in women.

Genotoxicity assays are widely used to identify the chemical compounds that would be able to induce DNA damage. To evaluate this effect, the micronucleus assay is suitable for this purpose as it is simple, and low cost with reproducible results⁹. The assay allows analyzing DNA alterations in exfoliated cells of the oral mucosa in a minimally invasive way, where it is possible to verify nuclear alterations, such as the presence of micronuclei (MN), binucleation (BN), and nuclear buds (NB) as indicators of genetic damage. Also, cytotoxicity through the phases of cell death, karyorrhexis (KR), pyknosis (PK), and karyolysis (KL) was evaluated in these individuals. The biological significance of the micronucleus lies in exposure to chemical agents, chronic diseases, and aging⁹.

In this context, this study aims to evaluate possible cytogenetic changes due to the continuous use of PrEP, which are not assessed in routine tests adopted in clinical practice By micronucleus assay. To the best of our knowledge, this approach has not been made so far. Certainly, such data will provide insights for better understanding regarding the safety of PrEP use

METHODS

Casuistics

The study was approved by the Institutional Human Ethics Committee from Federal University of São Paulo - Brazil, under protocol 0485/2019. All participants received a detailed explanation about the project, and the participants signed an informed consent form.

This study consisted of 37 individuals, of whom 17 comprised the PrEP group and 20 comprised the control group. A single examiner, a dentist, performed the collection, staining, and examination of the unidentified samples. A total of 17 volunteers from the PrEP group aged between 19 and 50 years were recruited under regular monitoring in the Specialized Care Service in the city of Santos, São Paulo, Brazil. Exclusion criteria were the absence of infectious diseases, oral lesions, and exposure to radiographic or tomographic exams in 15 days prior to sample collection. The control group was randomly recruited by a direct approach, in public places in the city of Santos, São Paulo, Brazil. Notably, 20 people were recruited, with the exclusion criteria similar to the PrEP group.

Cytogenetic assay

The oral mucosa MN test followed the protocol described by Belien et al. . With the help of a wooden spatula previously moistened with saline solution, gentle scraping was performed on the inner portion of the jugal mucosa on both sides. The stain used was Feulgen/Fast Green. The correct identification of metanuclear changes was proposed by Thomas et al.⁹ . For this, the following criteria were established for the correct identification of cytogenetic changes. MN: (1) intact main nucleus and cytoplasm; (2) diameter one-third of the main nucleus; (3) similar stain and texture of the main nucleus; and (4) MN in the same focus as that of the main nucleus.; KR: The nucleus may also exhibit extensive fragmentation indicative of advanced nuclear fragmentation; BN: Two main nuclei within a single cell and the nuclei are of similar size and staining intensity. NB: The main nucleus has a sharp constriction forming a bud of nuclear material being attached to the main nucleus by a narrow or wide nucleoplasmic bridge.; PK: The nucleus is small and shrunken with a diameter that is approximately one-third of that in a fully differentiated cell being uniformly and intensely stained.; KL: They do not have a DNA-containing nucleus or other structures that stain with Feulgen.

The repair index (RI), proposed by Ramirez and Saldanha¹¹, represented by the formula, $RI = (KL + KR) / (MN + NB)$, was also evaluated in this setting

Statistical analysis

All data were submitted for normalization using the Kolmogorov-Smirnov test. After that,

non-parametric data were confirmed by all data collected in this setting. The nonparametric Mann-Whitney test was used to evaluate the metanuclear alterations and DNA RI between the control and experimental groups. The statistical significance level was set at 5%.The statistical analysis was conducted by the Bio Stat software (version 5.0, Maringá-,Brazil).

RESULTS

All participants in the PrEP group were males and reported eating well, including fruits and vegetables; five participants used vitamin supplements, nine reported using mouthwash, the majority (15 people) reported taking alcoholic beverages, and five were smokers (less than 20 cigarettes/day). The minimum time of treatment with Truvada® was 1 month of continuous use, and the maximum time was 13 months. One participant was diabetic and hypertensive using metformin, and the other was hypertensive using valsartan. In the control group, all volunteers were also males and the age ranged from 20 to 51 years. A total of 5 volunteers were smokers, 10 reported using mouthwash, and none was taking any medication. The demographic characteristics are shown in Table 1.

Table 1. General characteristics of study participants.

Parameters	Control group (n=20)	PrEP group (n=17)
Mean age	35.2±9.6	34.6 ±9.7
Gender	M/20	M/17
Time of treatment		6.4 ±4.2
Tobacco smoking	5	5
Mouthrinse	9	10
Illicit drugs	5	5
Vitamins supplement	4	5
Chronicle diseases		3

The PrEP group showed an increase with a statistical difference compared with the control group for all mutagenicity parameters:, the frequency of MN (p=0.001), BN (p=0.001), and NB

($p=0.078$), according to Table 2. In cytotoxicity parameters, there was a statistical difference in the frequency of KR ($p=0.001$). In other parameters evaluated in this setting, KL ($p=0.57$) and PK ($p=0.8$), did not show significant differences ($p>0.05$), between groups according to the results presented in Table 3. The RI index is shown in Table 2; and the findings suggest the lower repair capacity in the PrEP group in oral mucosa cells when compared with the control group.

Table 2. Mean+S.D. frequency of cytogenetic changes related to mutagenicity in individuals submitted to pre-exposure prophylaxis use

Groups	MN	BN	NB	DNA repair index
Control	0.35 $\pm$ 0,6	0.3 $\pm$ 0,5	0.05 $\pm$ 0.2	198.5 $\pm$ 103.8
PrEP	2.35 $\pm$ 1.6*	4.3 $\pm$ 2.8*	0.7 $\pm$ 0.9*	104.6 $\pm$ 75.5*

* $p \leq 0.05$; MN; micronucleus; BN: binucleation; NB: nuclear bud.

Table 3. Mean+S.D. frequency of cytogenetic changes related to cytotoxicity in individuals submitted to pre-exposure prophylaxis use.

Groups	Normal cells	KL	KR	PK
Control	1,664.1 $\pm$ 48.3	195.7 $\pm$ 56	27.2 $\pm$ 6,5	112.5 $\pm$ 42.5
PrEP	1,617.7 $\pm$ 85	203.2 $\pm$ 66.4	48.9 $\pm$ 21.2*	122.7 $\pm$ 59.5

* $p \leq 0.05$; PK: pyknotic; KL: karyolysis; KR: karyorrhexis

DISCUSSION

According to the UNAIDS report, it was estimated that more than 1.6 million people worldwide would have received oral PrEP by the year 2021¹². The goal set for 2025 is 10 million people to use this HIV prophylaxis¹². Initially concentrated in high-income countries, a substantial increase has been observed in underdeveloped countries in the past 2 years. The rate of HIV infections worldwide has shown a steady decline, but in the last 5 years, this has been associated with the COVID-19 pandemic, as well as with the lack of prevention programs that especially reach the most vulnerable groups of people, as they account for more than half of new infections worldwide¹³.

The success of prophylactic treatment is widely documented as lowering the risk of contracting HIV by 90%, provided by good adherence to treatment¹³. Two dosing regimens are

proposed, daily and continuous use of one tablet, or on-demand use, which consists of using 2 tablets between 2- and 24 h before exposure, 1 tablet 24 h after the first dose, and 1 more tablet 48 h after the first dose, totaling 4 tablets, with good efficacy¹⁴. However, some adverse effects such as nausea, headache, flatulence, stool softening/diarrhea, and edema can be reported and can be treated symptomatically.

The association between tenofovir and emtricitabine has been described for PrEP use, but also severe cases depicted by lactic acidosis and hepatomegaly with steatosis and some rare fatalities, especially in women, obese people, and people who take this drug combination for prolonged use¹⁵. Tenofovir fumarate presents a potential risk of renal toxicity, and its prolonged use can lead to progressive loss of renal function, acute renal failure, and Fanconi syndrome. According to Jotwani et al.,¹⁶ subclinical changes in renal tubular function have been observed in people taking PrEP, warranting further study. Tenofovir fumarate is also related to decreased bone mineral density^{17,18}, although no increases in the number of fractures is documented. According to Havens et al.¹⁹, in a study on 15-22-year-olds, they showed bone loss after continuous PrEP use for 48 weeks, and with its discontinuation, there was partial or complete improvement after 48 months. Regarding the genotoxicity induced by these drugs, the results were largely obtained through experimental studies. Wu et al.²⁰ observed the genotoxicity of several antiretroviral drugs; Tenofovir was related to the presence of hepatocellular adenomas, carcinomas, and lung adenomas in rats. Emtricitabine showed no changes for genotoxicity and induction of carcinogenesis. Moraes Filho et al.^{21,22} used the test for somatic mutation and recombination detection comet assay in *Drosophila melanogaster* and micronucleus assay in bone marrow cells; Tenofovir promoted DNA damage by inducing mutational and/or recombination events, although it did not produce toxic effects.

Recently, Gutiérrez-Sevilla et al.²³ evaluated genomic instability, through the buccal mucosa micronucleus test, of people with HIV on different types of ARTs and also without medication, and increased BN cells and NB were detected in these individuals. However, there are no studies evaluating the cytogenetic changes in HIV-uninfected individuals undergoing PrEP use. In this study, we evaluated HIV-free individuals taking antiretroviral drugs as a preventive measure against HIV infection (PrEP). Mutagenicity, an irreversible cell damage factor, was evaluated by cell nucleus alteration events such as BN, MN, and NB. For this, we used the micronucleus test in exfoliated cells of the oral mucosa as this methodology has demonstrated a direct correlation with the micronucleus test in lymphocytes, with the advantage of being a minimally invasive, low-cost method that allows the evaluation of DNA injury. It has versatility and can be employed for various risk factors, such as environmental, nutritional, radioactive, licit, or illicit drug use, among others^{24,25}.

Our results revealed that all parameters closely related to mutagenicity showed a statistically significant increase compared with the control group. Cytotoxicity was assessed by cell death

parameters, in its distinct phases: PK, KR, and KL. KR, a less frequent event to be observed, as it represents a transition between the initial and final phases of cell death, showed a statistically significant increase when compared to with the control group, suggesting that the cell damage may be leading to more cell death events, even if not represented by PK and KL. Taken together, these results indicate that PrEP is capable of inducing genotoxicity and apoptosis in oral mucosal cells. The RI also showed a decrease in the PrEP group in buccal mucosal cells.

These results are completely new and, therefore, difficult to discuss at the present time. Anyway, we can infer that the ability to repair oral mucosa cells may be reduced in volunteers submitted to PrEP, favoring the processes of genotoxicity and cell death. However, further studies are needed to accurately assess this condition properly.

CONCLUSION

These results indicate that individuals undergoing PrEP use have geno- and cytotoxicity in oral mucosal cells. As PrEP plays a pivotal role in controlling HIV infection, especially in high-risk populations, further studies are needed to elucidate what tissues and organs are more vulnerable to PrEP, in addition to oral mucosa in humans. Certainly, such data will establish correctly and unequivocally the real risks of PrEP use in order to avoid danger to people

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The project was approved by the Research Ethics Committee of [the](#) Federal University of São Paulo (UNIFESP), Protocol number #3.461.911.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

conceptualization: MESA, MMC, DAR DATA curation: MESA, CMCBM, DVS
 formal analysis: MESA, DVS Funding acquisition: DAR Investigation: MESA, DAR
 Methodology: MESA, DVS Project administration: DAR Resources: DAR
 Software: DAR Supervision: DAR Validation: DAR
 Visualization: DAR, MESA, MMC, CMCBM Writing - original - MESA
 Writing - review - DAR

REFERENCES

1. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) de Risco à Infecção pelo HIV [Internet]. Brasil. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-profilaxia-pre-exposicao-prep-de-risco>.
2. World Health Organization (WHO). Global HIV Programme. Pre-exposure prophylaxis (PrEP) [Internet]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/prevention/pre-exposure-prophylaxis>.
3. Isabel Cristina Melo Mendes, (ICMM). AIDS 2022 OMS atualiza guidelines da profilaxia pré-exposição. Congresso [Internet]. Available from: <https://pebmed.com.br/ias-2022-novidades-dos-guidelines-da-oms-prep/>.
4. Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N Engl J Med*. 2012;367(5):399-410. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108524>
5. Fonner VA, Dalglisch SL, Kennedy CE, Baggaley R, O'Reilly KR, Koechlin FM, et al. Effectiveness and safety of oral HIV preexposure prophylaxis for all populations. *AIDS*. 2016;30(12):1973-83. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001145>
6. Tsai CC, Emau P, Follis KE, Beck TW, Benveniste RE, Bischofberger N, et al. Effectiveness of postinoculation (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl) adenine treatment for prevention of persistent simian immunodeficiency virus SIV_{mac} infection depends critically on timing of initiation and duration of treatment. *J Virol*. 1998;72(5):4265-73. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.4265-4273.1998>
7. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2587-99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011205>
8. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, et al. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science*. 2010;329(5996):1168-74. <https://doi.org/10.1126/science.1193748>
9. Beliën JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. 1995;16(10):2395-400. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.10.2395>
10. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: a systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;766:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.002>
11. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res*. 2002;1(3):246-60. PMID: 14963832
12. Unaid Global AIDS Update 2022. A new push for prevention [Internet]. Available from: <https://indanger.unaids.org/wp-content/uploads/2022/07/Prevention-1.pdf>.

13. Pan American Health Organization (PAHO). Oral Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP) of HIV infection -- eLearning tool for clinicians. [Internet]. Available from: <https://www.campusvirtualsp.org/en/course/oral-pre-exposure-prophylaxis-prep-hiv-infection-elearning-tool-clinicians-2021>
14. Molina JM, Ghosn J, Delaugerre C, Pialoux G, Katlama C, Slama L, et al. Incidence of HIV infection with daily or on-demand oral PrEP with TDF/FTC in France. *Topics Antiviral Med.* 2021;3:43-44. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(22\)00106-2](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00106-2)
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Emtricitabina + fumarato de tenofovir desoproxila. Registro sanitário MS nº 1.1524.0004. Diário Oficial de União nº 77 em 23/04/2018, através da Resolução-RE nº 977 de 19/04/2018 [Internet]. TRUVADA. São Paulo: Gilead Sciences Farmaceutica Do Brasil LTDA. Available atfrom: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351036639201992/?nomeProduto=Truvada>
16. Jotwani V, Scherzer R, Glidden DV, Mehrotra M, Defechereux P, Liu A, et al. Pre-exposure prophylaxis with tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine and kidney tubular dysfunction in HIV-uninfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2018;78(2):169-74. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001654>
17. Baranek B, Wang S, Cheung AM, Mishra S, Tan DH. The effect of tenofovir disoproxil fumarate on bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Antivir Ther.* 2020;25(1):21-32. <https://doi.org/10.3851/IMP3346>
18. Mulligan K, Glidden DV, Anderson PL, Liu A, McMahan V, Gonzales P, et al. Effects of emtricitabine/tenofovir on bone mineral density in HIV-negative persons in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2015;61(4):572-80. <https://doi.org/10.1093/cid/civ324>
19. Havens PL, Perumean-Chaney SE, Patki A, Cofield SS, Wilson CM, Liu N, et al. Changes in bone mass after discontinuation of preexposure prophylaxis with tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine in young men who have sex with men: extension phase results of adolescent trials network protocols 110 and 113. *Clin Infect Dis.* 2020;70(4):687-91. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz486>
20. Wu KM, Powley MW, Ghantous H. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. *Int J Toxicol.* 2012;31(3):211-21. <https://doi.org/10.1177/1091581812439585>
21. Moraes Filho AV, Jesus Silva Carvalho C, Verçosa CJ, Gonçalves MW, Rohde C, Melo E Silva D, et al. In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2017;820:31-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.012>
22. Moraes Filho AV, Carvalho CJ, Carneiro CC, Vale CR, Lima DC, Carvalho WF, et al. Genotoxic and cytotoxic effects of antiretroviral combinations in mice bone marrow. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165706>
23. Gutiérrez-Sevilla JE, Cárdenas-Bedoya J, Escoto-Delgadillo M, Zúñiga-González GM, Pérez-Ríos AM, Gómez-Meda BC, et al. Genomic instability in people living with HIV. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2021;865:503336. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503336>
24. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3):88-97. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>

25. Nersesyan A, Kundi M, Fenech M, Stopper H, Silva J, Bolognesi C, et al. Recommendations and quality criteria for micronucleus studies with humans. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2022;789:108410. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108410>
26. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009 Jun;4(6):825.



The importance of cytological studies in the oral epithelium from people submitted to HIV-pre-exposure prophylaxis (PrEP)

Maria Esther Suarez Alpire¹ · Daniel Araki Ribeiro¹

Received: 8 January 2023 / Accepted: 16 March 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

We read the recent paper published in the Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology titled “Inflammatory cytological alterations in the oral epithelium associated with HIV pre-exposure prophylaxis: a preliminary study” by Baggio et al. (2021) with much enthusiasm. In this study, the authors have demonstrated increased number of karyomegaly in oral exfoliated cells from people submitted to HIV-pre-exposure prophylaxis (PrEP). In addition, no significant differences were noticed to other cellular alterations evaluated in this study. However, we are able to present some issues for better understanding of the manuscript.

In the study, it was mentioned that “The entire slide was analyzed to determine the percentage of cells with the following alterations: karyomegaly, bi- or multinucleation, karyopyknosis, karyorrhexis, perinuclear halo formation, metachromasia, cytoplasmic vacuolization, indistinct cytoplasmic border, keratinization, and atrophy.” “To assess the presence of each inflammatory cell alteration and for further statistical analysis, the following scores were used: 1. Absent. 2. Rare: The alteration was detected in < 25% of the cells. 3. Discrete: The alteration was detected in 25–50% of the cells. 4. Moderate: The alteration was detected in 50–75% of the cells. 5. Severe: The alteration was detected in 75–100% of the cells.” First, how many cells were evaluated per volunteer? This was not described in the manuscript. Unquestionably, the total number of cells evaluated per individual significantly interferes with the quality of the data. Second, what were the criteria for identifying these alterations in the setting? This information must be presented in the manuscript since some doubts have been raised regarding data presented in the Table 1. Particularly, karyopyknosis

and karyorrhexis pointed out zero values either before or after HIV-pre-exposure prophylaxis (PrEP). How can this be explained from a biological perspective if these metanuclear changes correspond to the normal process of oral epithelial differentiation? Moreover, what does it mean cell atrophy? This needs further clarification.

Finally, the authors showed an increased number of karyomegaly in the group exposed to HIV-pre-exposure prophylaxis. However, a total of 11 volunteers (~ 47%) were smokers. There is a consensus that cigarette smoking causes cell death, especially in chronic smokers as indicative of metanuclear changes induced in oral mucosa cells (Pereira da Silva et al. 2015). This depends on the nicotine yield of cigarettes (Nersesyan et al. 2011). In this sense, the authors should present the data for smokers and non-smokers separately for both groups (before and after HIV-pre-exposure prophylaxis [PrEP]), since it is an important confounding factor for bio-monitoring studies in oral exfoliated cells.

We believe that these comments be relevant and necessary for better understanding the important article for bio-monitoring people submitted to HIV-pre-exposure prophylaxis (PrEP).

Acknowledgements DAR is a recipient from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number #001).

Funding cnpq, 001, Daniel Araki Ribeiro.

Data availability Data sharing are not available to this article.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

✉ Daniel Araki Ribeiro
 daribeiro@unifesp.br

References

- Baggio GL, Macedo NF, Merlin JC, Anghebem MI, Santos JCV, Ignácio SA, Rubira-Bullen IRF, Azevedo Alanis LR, Couto Souza PH (2021) Inflammatory cytologic alterations in the oral epithelium associated with HIV pre-exposure prophylaxis: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 131(5):534–539
- Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S (2011) Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis* 26(2):295–301
- Pereira da Silva VH, de Luna AR, Pompeia S, Ribeiro DA (2015) Cytogenetic biomonitoring in buccal mucosa cells from young smokers. *Acta Cytol* 59(6):474–478

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

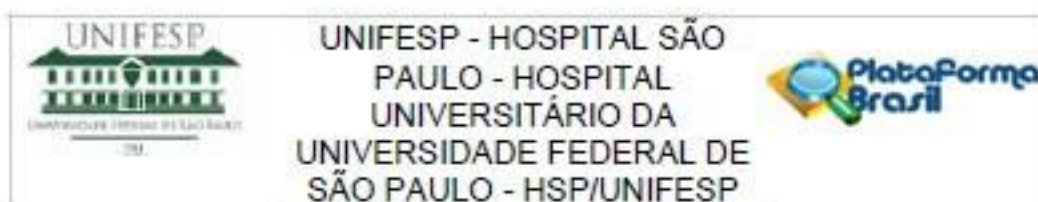
Archives of Toxicology

<https://doi.org/10.1007/s00204-023-03487-3>

5.1 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, nosso estudo sugere que a TARV está relacionada aos parâmetros alterados de mutagenicidade e citotoxicidade, diante da presença ativa ou não do vírus. O alerta em relação a possíveis danos genéticos para usuários da TARV, e mais estudos para identificar genotoxicidade, são relevantes para garantir qualidade de vida, principalmente a longo prazo e especialmente àqueles que podem optar por seu uso.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Continuação do Parecer: 3.481.911

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_crianca_HIV.docx	26/06/2019 12:04:13	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_HIV.docx	26/06/2019 12:04:04	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HIV.docx	26/06/2019 12:01:57	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cephiv_1.jpg	26/04/2019 18:57:07	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto
Folha de Rosto	PBHiv.pdf	09/04/2019 20:56:58	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto
Outros	autorizasantos.pdf	26/03/2019 20:12:02	MARIA ESTHER SUAREZ ALPIRE SANTANA	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Julho de 2019

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-060
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1082 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br